

Caracterização e recuperação de proteínas de subprodutos de pescado

Rita Alexandra Fernandes Salgado

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar

Orientador: Doutora Carla Maria Feio Pires

Co-orientador: Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;
Doutora Carla Maria Feio Pires, Investigadora Auxiliar do Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I.P., orientadora.

AGRADECIMENTOS

À Engenheira Carla Pires por todo o tempo despendido na orientação deste trabalho. Agradeço-lhe também pela forma como me recebeu, pelo apoio e ajuda prestados no laboratório e durante a realização da parte escrita da dissertação e por todos os seus bons conselhos.

Ao Engenheiro Irineu por todo o apoio e ajuda prestada na elaboração desta dissertação e pela sua disponibilidade e conhecimento transmitido.

Ao professor Miguel Mourato por ter co-orientado este trabalho, pela sua disponibilidade e ajuda prestada.

À professora Anabela Raymundo, pela sua prontidão e apoio prestado nos ensaios do reómetro.

Ao rei, à rainha e à princesa do meu castelo, por todo o esforço e compreensão ao longo de todas as etapas e por me proporcionarem todas as condições para alcançar os meus objectivos. Obrigado pela vossa paciência (e persistência) e por todo o vosso carinho e dedicação.

Aos ausentes, Kika e Horacinho, por tudo o que contribuíram em vida e por todos os valores transmitidos.

Resumo

Os subprodutos de pescado constituem uma fonte de proteínas e lípidos passíveis de valorização. Os objetivos deste trabalho foram: recuperar proteínas por solubilização alcalina e ácida e precipitação no pl; remover fosfolípidos nas proteínas solubilizadas usando CaCl_2 e ácido cítrico; caracterizar propriedades funcionais, texturais e reológicas das proteínas recuperadas. Os teores de proteína e gordura das proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) eram 75,9 e 14,4 %, respetivamente, e os das recuperadas por solubilização ácida (PR_AC) 47,8 e 17,0 %. As PR_ALC apresentavam maior capacidade de retenção de água (2,97 g água/g amostra) e estabilidade da emulsão (88,5 %), mas nenhuma apresentava capacidade de formação de espuma. A capacidade de retenção de gordura foi 2,95 e 3,28 g óleo/g amostra das PR_ALC e das PR_AC, respetivamente. O Índice de Atividade Emulsionante das PR_AC e PR_ALC era 3,19 e 3,67 m^2/g , respetivamente. As PR_ALC tinham força do gel de 381,83 g.cm e 24,37 N de dureza. O comportamento reológico das proteínas recuperadas foi semelhante, embora os valores de G' e G'' das PR_ALC fossem superiores aos das PR_AC. Os valores de L^* e a^* eram mais elevados nas PR_ALC, mas o valor de b^* das PR_AC era superior. As PR_ALC apresentavam maior brancura.

Na solubilização ácida ocorreu uma remoção de fosfolípidos de cerca 90 % quando a relação peixe:água era de 1:6 e de 82 % com a relação 1:9. Na solubilização alcalina esta remoção foi cerca de 75 % usando também a relação 1:9.

As maiores percentagens de remoção de fosfolípidos foram conseguidas com concentrações de 5-10 mM de CaCl_2 e 1-5 mM de ácido cítrico. Assim, o tratamento com ácido cítrico 5 mM e CaCl_2 8 mM das PR_AC permitiu remover 59 % (relação 1:6) e 41% (relação 1:9) de fosfolípidos e 74% das PR_ALC (relação 1:9).

Palavras-chave: solubilização ácida e alcalina, proteínas recuperadas, propriedades funcionais, propriedades da textura e reológicas, remoção de fosfolípidos

Abstract

Fish byproducts are a source of proteins and lipids liable to improvement.

The aims of this work were: protein recovery by the shifting pH method and isoelectric precipitation; phospholipids removal on soluble proteins by adding CaCl_2 and citric acid; characterization of functional, textural and rheological properties of recovered proteins.

Alkaline recovered proteins (PR_ALC) contained 75.9 % protein and 14.4 % fat and acidic recovered proteins (PR_AC) contained 47.8 % e 17.0 %, respectively.

PR_ALC had higher water holding capacity (2.97 g/ g-sample) and emulsion stability (88,5 %), but none of them exhibited foaming capacity. Fat absorption was 2.95 and 3.28 g/g-sample of PR_ALC e PR_AC, respectively. Emulsifying activity index was respectively 3.19 and 3.67 m²/g for PR_AC and PR_ALC respectively. The gel strength of PR_ALC was 381.83 g.cm and hardness was 24.37 N.

Rheological behavior of recovery proteins was similar, but the G' and G'' moduli were higher in PR_ALC.

The L^* and a^* value were higher in PR_ALC but had a lower b^* value. PR_ALC was also whiter than PR_AC.

The acid solubilization led to a decrease of 90 % of phospholipids with 1:6 fish:water ratio and 82 % with 1:9 ratio. At alkali solubilization the phospholipids removal was about 75 % with 1:9 relation.

At 5-10 mM CaCl_2 and 1-5 mM citric acid showed an optimal effect on phospholipids removal.

In the presence of citric acid and CaCl_2 phospholipid removal from PR_AC was 59 % (1:6 ratio) and 41 % (1:9 ratio) and 74 % for PR_ALC (1:9 ratio).

Key-words: acid and alkaline solubilization, recovered proteins, functional properties, texture and rheological properties, phospholipids removal.

ÍNDICE

PARTE I - INTRODUÇÃO	1
1. Introdução geral	1
PARTE II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2. As proteínas – visão geral	3
2.1. As proteínas – no músculo do pescado	4
2.1.1. Proteínas sarcoplasmáticas.....	4
2.1.2. Proteínas miofibrilares	5
2.2. Propriedades funcionais das proteínas	5
2.2.1. Interação proteína-água	6
2.2.1.1. Solubilidade	6
2.2.1.2 Capacidade de retenção de água	7
2.2.2. Interação proteína-água-proteína	7
2.2.2.1. Viscosidade	7
2.2.2.2. Gelificação das proteínas	8
2.2.2.2.1. Mecanismo da gelificação	9
2.2.2.2.2. Condições do processo	9
2.2.2.2.3. Solubilização das proteínas.....	10
2.2.2.2.4. <i>Setting</i>	10
2.2.2.2.5. Aquecimento.....	11
2.2.3. Interação proteína-lípidos e proteína-gases.....	11
2.2.3.1. Capacidade de emulsificação.....	11
2.2.3.2. Capacidade de formação de espuma	12
2.3. Recuperação de proteínas através da solubilização/precipitação no ponto isoeletrico	12
2.3.1. Processo	13
2.4. Os lípidos no pescado	15
2.4.1. Fosfolípidos	16
2.5. Propriedades texturais e reológicas dos géis.....	17
2.5.1. Testes empíricos	17
2.5.1.1. Testes de penetrometria.....	17

2.5.2. Testes fundamentais	18
2.5.2.1. Testes reológicos	18
2.5.2.2. Testes oscilatórios	18
2.5.3. Teste imitativos	19
2.5.3.1. Análise de perfil de textura (TPA)	19
PARTE III - MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Material	22
3.2. Recuperação de proteínas por solubilização ácida e alcalina	23
3.3. Remoção dos fosfolípidos das proteínas solubilizadas	25
3.3.1. Efeito do tratamento com cloreto cálcio e ácido cítrico	25
3.3.2. Efeito da relação peixe:água	27
3.3.3. Efeito do pH de solubilização	29
3.4. Composição química e fosfolípidos	29
3.4.1. Humidade	29
3.4.2. Gordura livre	30
3.4.3. Proteína total	31
3.4.3.1. Determinação da proteína pelo método de Dumas	31
3.4.3.2. Determinação da proteína pelo método de Kjeldahl	31
3.4.4. Cinza	31
3.4.5. Determinação do teor de fosfolípidos	32
3.5. Propriedades funcionais das proteínas recuperadas	33
3.5.1. Capacidade de retenção de água/ gordura	33
3.5.2. Capacidade de formação da espuma	34
3.5.3. Estabilidade da emulsão	35
3.5.4. Índice de Atividade Emulsionante	35
3.5.5. Capacidade de gelificação das proteínas	36
3.5.5.1. Preparação dos géis tipo <i>kamaboko</i>	36
3.5.5.2. Avaliação da textura dos géis tipo <i>kamaboko</i>	38
3.5.5.3. Avaliação do comportamento reológico dos géis tipo <i>kamaboko</i>	38
3.5.6. Determinação da Cor	39
3.7. Tratamento estatístico	40
PARTE IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO	41

4.1. Recuperação de proteínas por solubilização ácida e alcalina	41
4.1.1. Composição química	41
4.2. Propriedades funcionais das proteínas recuperadas	42
4.2.1. Capacidade de retenção de água/gordura.....	42
4.2.2. Capacidade de formação de espuma	44
4.2.3. Estabilidade da emulsão.....	44
4.2.4. Índice de Atividade Emulsionante.....	45
4.2.5. Capacidade de gelificação dos géis tipo <i>kamaboko</i>	46
4.2.5.1. Avaliação da textura	46
4.2.5.1.1. Teste de penetrometria	46
4.2.5.1.2. Teste TPA.....	48
4.2.5.2. Avaliação do comportamento reológico	49
4.3. Determinação da cor das proteínas recuperadas	53
4.4. Remoção dos fosfolípidos	55
4.4.1. Distribuição dos fosfolípidos.....	55
4.4.2- Efeito da concentração de CaCl ₂ e ácido cítrico	56
4.4.3. Efeito do pH de solubilização e da relação peixe:água	58
PARTE V – CONCLUSÃO	60
5.1. Conclusões gerais.....	60
Referências bibliográficas	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Interações entre as proteínas e a água no processo de recuperação de proteínas por solubilização ácida ou alcalina no ponto isoelétrico (adaptado de Jaczynski, 2008).	13
Figura 2 - Estrutura química dos fosfolípidos (adaptado de Jaczynski, 2008).	16
Figura 3 - Representação esquemática do perfil típico de um teste de penetrometria.	18
Figura 4 - Representação esquemática do perfil típico de um teste TPA.	20
Figura 5 - Processo de recuperação de proteínas por solubilização ácida e alcalina, de acordo com o método descrito por Hultin e Kelleher (1999) e por Hultin e Kelleher (2000), respetivamente.	24
Figura 6 - Procedimento utilizado para avaliar o efeito do tratamento com CaCl_2 e ácido cítrico na remoção de fosfolípidos de acordo com o descrito por Liang e Hultin (2005).	26
Figura 7 - Procedimento utilizado para avaliar o efeito da relação peixe:água na remoção de fosfolípidos.	28
Figura 8 - Determinação da capacidade de gelificação das proteínas de acordo com Mendes (2001).	37
Figura 9 - Capacidade de retenção de água (WHC) das proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC).e do caseinato de sódio.	42
Figura 10 - Capacidade de retenção da gordura (FA) das proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC) e do caseinato de sódio.	43
Figura 11- Estabilidade das emulsões (ES) formadas pelas proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC) e pelo caseinato de sódio.	45
Figura 12- Índice de Atividade Emulsionante do caseinato e das proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC).	45
Figura 13 - Representação da força de rutura (A), da distância à rutura (B) e da força dos géis (C) das proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC).	47
Figura 14 - Curvas de aquecimento de 20 a 90 °C dos géis de proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC).	49
Figura 15 - Curvas de arrefecimento de 20 a 90 °C dos géis de proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC).	51
Figura 16- Cinéticas de maturação a 5 °C dos géis de proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC).	52

Figura 17- Espectro mecânico a 5 °C dos géis de proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC).	53
Figura 18 - Distribuição dos fosfolípidos nas várias frações na matéria-prima moída (MP) e após solubilização ácida (AC) ou solubilização alcalina (ALC) com as relações 1:6 e 1:9 (peixe:água).	55
Figura 19 - Efeito da concentração de CaCl_2 na remoção dos fosfolípidos das proteínas solubilizadas em condições ácidas com a relação 1:6 (peixe:água) na presença de 5 mM de ácido cítrico.....	56
Figura 20 - Efeito da concentração de ácido cítrico na remoção dos fosfolípidos das proteínas solubilizadas com a relação 1:6 (peixe:água) na presença de 8 mM de CaCl_2	57
Figura 21 - Distribuição dos fosfolípidos nas várias frações obtidas após tratamento com CaCl_2 8 mM e ácido cítrico 5 mM na solubilização ácida (AC) e alcalina (ALC).	58
Figura 22 - Efeito do pH de solubilização e da relação (peixe:água) na remoção dos fosfolípidos após tratamento com 5 mM de ácido cítrico e 8 mM de CaCl_2	59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades funcionais baseadas nas interações das proteínas com diferentes moléculas. (adaptado de Sikorski, 2001).....	6
Tabela 2 - Rendimento da recuperação de proteínas por solubilização/ precipitação isoelétrica de proteínas a diferentes pH (Jaczynski, 2008).	15
Tabela 3- Espécies de peixes nas misturas usadas como matéria-prima na recuperação ácida e alcalina de proteínas.	22
Tabela 4- Composição química da matéria-prima utilizada na recuperação de proteínas por solubilização alcalina (MP_ALC) e ácida (MP_AC) e das proteínas obtidas por estes dois processos (PR_ALC e PR_AC).	41
Tabela 5 - Análise de perfil de textura dos géis formados pelas proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC).	48
Tabela 6 – Determinação instrumental da cor – coordenadas L*, a* e b* e da brancura (W) das proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC).....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	absorvância
AC	solubilização ácida
ALC	solubilização alcalina
ANOVA	análise de variância
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
conc.	concentração
EAI	Índice de Atividade Emulsionante
EC	capacidade de emulsificação
FA	capacidade de absorção de gordura
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nation
FC	capacidade de formação de espuma
G*	módulo complexo dinâmico
G'	módulo de conservação
G''	módulo de dissipação
MP_AC	matéria-prima (peixe moído) usada nas solubilizações ácidas
MP_ALC	matéria-prima (peixe moído) usada na solubilização alcalina
NP	norma portuguesa
pl	ponto isoelétrico
PR_AC	proteínas recuperadas por solubilização ácida
PR_ALC	proteínas recuperadas por solubilização alcalina
TGase	transglutaminase
TPA	Análise de Perfil de Textura
WHC	capacidade de retenção de água

PARTE I - INTRODUÇÃO

1. Introdução geral

A indústria de pescado tem na economia global um lugar de destaque. Em 2011, de acordo com os dados mais recentes da FAO, esta indústria foi responsável pela captura de 154 milhões de toneladas de peixe em regime de captura e de aquacultura, das quais cerca de 131 milhões de toneladas se destinaram a consumo humano. Estes valores traduziram-se, para o ano de 2011, num consumo de 18,8 kg de peixe *per capita*. Estes dados provam a importância crescente do pescado na dieta alimentar, que consequentemente apresenta um revés: declínio das populações de várias espécies de pescado, devido à elevada captura (FAO, 2012).

Este problema global obrigou a repensar estratégias para conseguir uma gestão mais sustentável das matérias-primas da indústria de pescado, uma vez que esta indústria, como qualquer outra, não está isenta de desperdícios nem da obtenção de subprodutos.

O pescado tem, desde há muito, o seu valor nutricional comprovado na dieta alimentar, muito devido ao reconhecimento do mesmo como uma fonte primordial de proteína. No entanto, a existência de outros componentes que se provaram benéficos na alimentação humana, nomeadamente, gorduras insaturadas do tipo ómega-3 e fosfolípidos, fizeram aumentar ainda mais o interesse pelo pescado. Este interesse foi manifestado não só pela indústria alimentar, como também por indústrias de *pet food*, indústrias farmacêuticas e indústrias de cosméticos. As potencialidades do pescado fizeram repensar a utilização dos desperdícios e subprodutos provenientes desta indústria, tentando incrementar o valor económico dos mesmos.

Na indústria de pescado os subprodutos são normalmente aproveitados para fazer farinha de peixe, que depois é utilizada para incorporação em *pet food*. No entanto, não é um produto que represente grandes retornos económicos, o que fez com que as empresas comessem a avaliar outras potencialidades dos subprodutos para os tornar numa mais-valia económica.

Neste trabalho pretendeu-se valorizar os subprodutos de pescado através da recuperação de proteínas. A recuperação proteica foi feita por processos de solubilização ácida e solubilização alcalina seguidos, em ambos os casos, de precipitação isoelétrica das proteínas. Para caracterizar as proteínas recuperadas secas resultantes dos processos de solubilização pretendeu-se determinar a respetiva composição química, propriedades funcionais e os parâmetros da cor. A partir das proteínas recuperadas foram preparados géis proteicos dos quais se avaliaram as propriedades de textura através da análise de perfil de textura (TPA) e as propriedades viscoelásticas através do varrimento em tempo, temperatura e frequência.

Para além disso, outro dos objetivos do trabalho foi a remoção de fosfolípidos durante o processo de recuperação de proteínas. Quis-se testar o efeito das relações de solubilização peixe:água, o efeito pH e o efeito do tratamento com ácido cítrico e CaCl_2 na remoção dos fosfolípidos presentes nas proteínas solubilizadas. Como a presença de fosfolípidos nas proteínas solubilizadas afeta a posterior qualidade dos produtos resultantes, a remoção dos mesmos pode valorizar os subprodutos de pescado.

PARTE II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. As proteínas – visão geral

As proteínas são macromoléculas funcionalmente versáteis, não só devido às funções que desempenham a nível biológico (Sikorski, 2001) como também ao papel que desempenham a nível tecnológico, nomeadamente na indústria alimentar.

As proteínas são compostas por mais de 20 aminoácidos, nove dos quais essenciais, que se encontram unidos entre si por ligações peptídicas (amida), formando cadeias polipeptídicas, que diferem no número e na sequência de aminoácidos que as constituem.

O comportamento funcional das proteínas depende da sua organização estrutural, das quais se consideram quatro níveis estruturais (Sikorski, 2001). A estrutura primária das proteínas é caracterizada pela sequência linear de ligações amida entre os aminoácidos, onde o arranjo espacial dos resíduos de aminoácidos não é tido em conta a este nível estrutural. Na estrutura secundária considera-se a conformação espacial dos átomos na cadeia polipeptídica principal, que é responsável pela formação de estruturas secundárias, sendo as mais comuns a conformação em hélice (α -hélice) ou em folhas pregueadas (β -hélice). O arranjo tridimensional dos átomos da cadeia polipeptídica principal representa a estrutura terciária das proteínas, em que segmentos da estrutura secundária se ligam tridimensionalmente por ligações não covalentes, nomeadamente pelas forças de Van der Waals, ligações electrostáticas, ligações de hidrogénio e por outras ligações covalentes: as pontes de enxofre. Por último, na estrutura quaternária existe uma relação espacial entre os polipéptidos, ou subunidades, das cadeias polipeptídicas dentro da proteína, onde as interações não covalentes na interface das subunidades, como as ligações electrostáticas e ligações de hidrogénio, contribuem para a estabilização da mesma (Sikorski, 2001).

2.1. As proteínas – no músculo do pescado

As proteínas, como constituintes estruturais dos organismos vivos, fazem do pescado uma fonte primordial de proteína na dieta alimentar.

No pescado, as proteínas encontram-se no músculo, que constitui a fração edível do peixe, correspondente a cerca de metade do peso total do corpo (Pires, 2008). Estruturalmente, o músculo pode ser distinguido em três tipos: o músculo-esquelético estriado, músculo liso e o músculo cardíaco (Suzuki, 1987). O músculo-esquelético estriado é o componente principal da carne de pescado e com maior interesse a nível do consumo e da indústria alimentar (Mendes, 1991), constituído por fibras musculares paralelas entre si e ligadas por tecido de ligação. Por sua vez, o músculo liso encontra-se nas vísceras do pescado e nos moluscos e, finalmente, o músculo cardíaco que se caracteriza por ser uma estrutura intermédia em relação aos dois músculos referidos anteriormente (Suzuki, 1987).

O pescado apresenta também dois tipos de músculo estriado – o claro e o escuro – com constituição fibrilar e composição química distintas. Em relação ao músculo escuro, é constituído por uma proporção maior de fibras escuras, que formam uma camada superficial sob a pele do peixe, ao longo da sua linha lateral e é aquele que também apresenta um teor mais elevado de gordura, ácidos gordos, mioglobina e enzimas (Mendes, 1991). Já o músculo claro tem uma proporção predominante de fibras claras, representando a maior parte do corpo do peixe e com distribuição uniforme no mesmo. As fibras claras são formadas por elevadas quantidades de glicogénio e de enzimas glicolíticas, o que faz com que o músculo claro se contraia mais rapidamente que o músculo escuro (Mendes, 2001).

A composição química do músculo está dependente de fatores como a forma, a idade e a época de captura do peixe, em que o teor de proteína se situa entre 19 a 23 % (Kijowski, 2001). As proteínas do músculo podem ser classificadas em três grupos de acordo com a sua solubilidade e com as diferentes posições que as proteínas ocupam no músculo: proteínas sarcoplasmáticas ou solúveis, proteínas miofibrilares ou contrácteis e proteínas do estroma ou insolúveis (Kijowski, 2001).

2.1.1. Proteínas sarcoplasmáticas

As proteínas sarcoplasmáticas, as quais também se podem designar por miogénio, são formadas por cerca de 100 proteínas diferentes, encontrando-se no sarcoplasma. Representam uma fração proteica solúvel em água e com pesos moleculares relativamente baixos, cuja percentagem no pescado está condicionada pela espécie (Tahergorabi e Jaczynski, 2014)

A extração destas proteínas é possível através da compressão da polpa de pescado, sendo eliminadas nas águas de lavagem do processo tradicional de produção de *surimi* (Tahergorabi e Jaczynski., 2014)

2.1.2. Proteínas miofibrilares

As proteínas miofibrilares encontram-se nas miofibrilas, as quais incluem a miosina e a actina, que são miofilamentos que se distinguem pela espessura, e pelas proteínas reguladoras como a troponina e actinina (Sikorski, 2001).

Estas proteínas, de acordo com a função fisiológica desempenhada no músculo, classificam-se em proteínas reguladoras e em proteínas contráteis, que devem essa denominação ao facto de estarem envolvidas no mecanismo de contração do músculo (Suzuki, 1987)

A nível tecnológico, devido à solubilidade em soluções salinas de elevada força iónica, são importantes no processamento de polpas de pescado, visto serem responsáveis pela coagulação e gelificação dos produtos resultantes dessas polpas (Mendes, 2001)

2.2. Propriedades funcionais das proteínas

Na indústria alimentar, as propriedades funcionais dos alimentos processados são determinadas pelas proteínas, as quais são responsáveis por algumas características sensoriais e pelo comportamento reológico dos produtos resultantes, como por exemplo, a viscosidade, suculência e textura, afetando, por isso, a qualidade do produto final (Sikorski, 2002). Assim sendo, as propriedades funcionais das proteínas podem definir-se como as propriedades que afetam o seu comportamento num sistema alimentar durante a preparação, processamento, armazenagem e consumo (Kinsella, 1976).

As propriedades funcionais das proteínas devem-se à interação das proteínas com o solvente, iões e lípidos e aos fenómenos de superfície, as quais são afetadas por diversos fatores de natureza intrínseca (fatores primários) e extrínseca (Sikorski, 2001). Na tabela 1, apresentam-se as propriedades funcionais mais importantes baseadas nas interações das proteínas com diferentes moléculas.

Intrinsecamente, os fatores que afetam o comportamento das proteínas dizem respeito à sua composição em aminoácidos, à sequência desses resíduos e ao peso molecular. Com efeito, também a estrutura das proteínas, nomeadamente a estrutura terciária e quaternária, a hidrofobicidade, a carga global e a distribuição de cargas, o ponto isoelétrico e a flexibilidade da molécula são condicionados pelos fatores primários (Sikorski, 2001).

No respeitante aos fatores extrínsecos, o comportamento das proteínas depende das condições do ambiente que as rodeia, nomeadamente do carácter do solvente, temperatura, pH, força iónica, da presença de agentes desnaturantes, de outras macromoléculas e lípidos e também da atividade enzimática (Sikorski, 2001).

Tabela 1 - Propriedades funcionais baseadas nas interações das proteínas com diferentes moléculas. (adaptado de Sikorski, 2001)

Água	Água e Proteínas	Lípidos e gases
<i>Wet ability</i> Aumento de volume Rehidratação Capacidade de retenção de água Solubilidade	Viscosidade Capacidade de gelificação Formação de fibras Formação de membranas Formação de massa	Capacidade de emulsificação Estabilização de emulsões Capacidade de formação de espuma Estabilização de espuma

2.2.1. Interação proteína-água

Da interação das proteínas com um solvente, neste caso a água, o componente mais abundante da generalidade dos alimentos, resultam algumas das suas propriedades funcionais: solubilidade e capacidade de retenção de água.

2.2.1.1. Solubilidade

A solubilidade representa uma importante propriedade funcional das proteínas, pois interfere noutras propriedades como a capacidade de gelificação, emulsificação e formação de espuma das proteínas (Sikorski, 2002).

A solubilidade ou extratibilidade pode ser definida como a percentagem de proteína total passível de ser extraída pela água ou por outro solvente, nas condições adequadas. A solubilidade depende não só das propriedades das proteínas, como também das condições de extração, sobretudo do grau de desnaturação, do pH e da força iónica do solvente e também da temperatura que afetam diretamente a natureza hidrofóbica e/ou iónica das proteínas (Sikorski, 2001). A perda de solubilidade das proteínas é um indicativo da desnaturação proteica, consequência do seu processamento (Sikorski, 2001). A solubilidade das proteínas em diferentes solventes pode ser alterada química ou enzimaticamente, através da modificação do grau de agregação, da conformação, da hidrofobicidade e da carga das moléculas (Sikorski, 2001).

A solubilidade das proteínas em soluções aquosas depende do pH, onde um aumento da solubilidade é possível quando se registam valores de pH acima ou abaixo do ponto isoelétrico (pI) das proteínas, aumento esse promovido pela carga positiva ou negativa que estas adquirem, pela ionização dos resíduos carregados e pela repulsão electrostática entre as cadeias proteicas e forte interação com as moléculas de água. Já o mínimo de solubilidade das proteínas regista-se no pI, uma vez que a esse valor de pH não existe repulsão electrostática, promovendo a agregação entre as moléculas de proteína. A presença de sais permite alterar ligeiramente o pI das proteínas (Stryer, 1996). Para estabelecer o valor de pH mais apropriado para a solubilização e recuperação de proteínas numa solução proteica, recorre-se a uma curva de solubilidade vs. pH (Sikorski, 2002).

2.2.1.2 Capacidade de retenção de água

A capacidade de retenção de água (WHC) das proteínas permite avaliar a sua interação com a água e constitui uma medida indireta do seu grau de desnaturação. Trata-se de uma propriedade com grande relevância na indústria alimentar, uma vez que influencia a qualidade dos produtos obtidos, a nível de textura e suculência (Sikorski, 2002).

A retenção de água nos alimentos deve-se a interação da água com macromoléculas, solutos e outras estruturas presentes nessas matrizes alimentares. Nos géis proteicos à base de proteínas do músculo de pescado, a capacidade de retenção de água varia com os fatores que afetam a formação do gel, nomeadamente o pH e a força iónica. Como tal, géis com uma matriz mais forte têm uma WHC elevada enquanto, géis mais fracos apresentam uma WHC reduzida, que pode levar a perda de água (Ingadottir, 2004).

2.2.2. Interação proteína-água-proteína

2.2.2.1. Viscosidade

A viscosidade ou consistência é outra das propriedades funcionais das proteínas que condiciona a aceitabilidade dos produtos alimentares pelo consumidor. A viscosidade é influenciada pelo tipo de soluto e pelas propriedades das moléculas, nomeadamente pela forma, tamanho, flexibilidade e hidratação (Damodaran, 1997). Para além disso, fatores como o pH, temperatura, concentração de proteína e força iónica, também interferem na viscosidade uma vez que alteram a respetiva conformação (Ingadottir, 2004).

Por exemplo, em soluções proteicas com elevada concentração de proteína, a viscosidade aumenta exponencialmente devido ao aumento das interações entre as moléculas hidratadas. Para além disso, em soluções proteicas com comportamento pseudoplástico, verifica-se uma diminuição da viscosidade aparente com o aumento da velocidade de deformação, aumento esse que pode conduzir a uma diminuição das interações das moléculas de proteína e, por conseguinte, a um rompimento da rede proteica. Também para soluções proteicas de elevada força iónica, a viscosidade diminui pois a capacidade de hidratação das moléculas é afetada (Sousa, 2001).

Tecnologicamente é importante que a viscosidade de homogeneizados de proteínas, obtidos a partir da extração de proteínas por solubilização ácida ou alcalina, registe valores relativamente baixos, para facilitar a separação de materiais insolúveis das proteínas solubilizadas.

2.2.2.2. Gelificação das proteínas

As proteínas têm a capacidade de formar géis firmes e elásticos quando sujeitas a adequados tratamentos térmicos ou outros. As proteínas gelificadas formam uma rede tridimensional capaz de reter moléculas de água e outros compostos de baixo peso molecular, apresentando-se como um estado intermédio entre um sólido e um líquido. Damodaran (1997) considerou dois tipos de gel: coágulo ou gel translúcido. Um gel do tipo coágulo forma-se quando as proteínas apresentam um elevado número de resíduos de aminoácidos não polares, enquanto um gel translúcido se forma quando as proteínas possuem uma predominância de aminoácidos hidrofílicos.

A estrutura de um gel proteico está dependente de fatores intrínsecos das proteínas e das condições que afetam a taxa de desnaturação. Deste modo, o tipo de gel proteico depende, primeiramente, da composição em aminoácidos das proteínas que a constituem e das condições da solução, nomeadamente do pH, da força iónica, concentração proteica e das taxas de aquecimento e arrefecimento. De acordo com Ingadottir (2004), o pH e a força iónica são os fatores determinantes na qualidade e força dos géis de proteínas do músculo, situando-se o pH ótimo de gelificação das proteínas entre 5,5 e 7,0, de acordo com a espécie do pescado, a concentração proteica e a concentração de sal. No músculo, as proteínas responsáveis pela formação e força do gel são as proteínas miofibrilares, em especial a miosina e a actina.

2.2.2.2.1. Mecanismo da gelificação

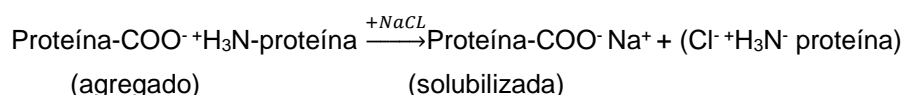
A gelificação ocorre normalmente em duas etapas (Sikorski, 2001). Na primeira etapa, ocorre a dissociação da estrutura quaternária das proteínas e, por conseguinte, o desdobramento da molécula. Esta etapa ocorre a temperaturas que rondam os 40 °C, dependendo da estabilidade térmica das proteínas. Na segunda etapa, que ocorre a temperaturas mais elevadas, as moléculas desnaturadas reorganizam-se e formam uma estrutura tridimensional, através da interação com os grupos laterais das cadeias. Na maioria das proteínas, as interações que ocorrem primeiro devem-se à exposição de sequências hidrófobas nas cadeias polipeptídicas. Depois destas duas etapas, é o arrefecimento que permite a estabilização da estrutura do gel. As propriedades do gel resultante dependem da taxa em que ocorrem ambas as etapas no processo. Assim, se as condições forem favoráveis às interações entre as moléculas desnaturadas, ou seja, favorecerem a primeira etapa, as cadeias polipeptídicas que sofreram desdobramento podem formar rapidamente um gel irreversível do tipo coágulo, devido às associações que ocorrem aleatoriamente entre os polímeros de elevado peso molecular. Por conseguinte, caso a segunda etapa ocorra em maior taxa do que a desnaturação, as proteínas desdobradas podem reorganizar-se num outro tipo de estrutura de gel, um gel translúcido, que apresenta a particularidade de ser termo-reversível (Sikorski, 2001).

2.2.2.2.2. Condições do processo

A capacidade de gelificação é afetada pela concentração de proteínas, pela presença de sais e pelo pH (Sikorski, 2001). De acordo com Suzuki (1981), o processo de formação de um gel a partir de proteínas miofibrilares do músculo do pescado trata-se de um complexo conjunto de alterações físico-químicas das proteínas do pescado. O processo de formação de um gel pode então dividir-se nas seguintes etapas principais: solubilização das proteínas, *setting* e aquecimento.

2.2.2.2.3. Solubilização das proteínas

Na solubilização das proteínas utiliza-se normalmente sal (0,4-0,6 M) sendo considerado um pré-requisito para a formação de um bom gel a partir de proteínas miofibrilares (Hultin *et al.*, 2005). A adição do sal leva à rutura das ligações iónicas entre as cadeias proteicas e ajuda à formação de uma dispersão homogénea das proteínas, a qual é necessária para o desenvolvimento de uma estrutura elástica do gel após o aquecimento (Lanier *et al.*, 2005). Durante a homogeneização forma-se uma pasta viscosa, denominada por sol (solução de actomiosina onde as moléculas se encontram dispersas de forma desordenada) que se caracteriza por uma elevada capacidade de retenção de água. Esta elevada capacidade de retenção da água, que permite a solubilização, deve-se ao facto dos iões permitirem uma maior hidratação das proteínas ao ligarem-se aos grupos de carga oposta expostos na superfície das proteínas. Deste modo, as ligações intermoleculares entre as proteínas rompem-se e as proteínas solubilizam na água (Niwa, 1992). As reações que ocorrem entre as proteínas e o sal traduzem-se na seguinte reação química (Lanier *et al.*, 2005):



2.2.2.2.4. Setting

À pasta viscosa resultante aplica-se um tratamento térmico a temperaturas relativamente baixas (inferiores a 50 °C), que leva à formação de um gel translúcido, o *suwari*. O *suwari* é a consequência da transformação gradual do sol em gel, originando uma rede proteica de baixa densidade e translúcida que forma géis termoestáveis, em que a natureza das ligações não permite a reversibilidade do estado de dissolução (Mendes, 2001).

A etapa que leva à formação do *suwari* designa-se por *setting* e, de acordo com a espécie do pescado, pode ocorrer com diferentes intensidades num intervalo variável de temperaturas, mas nunca acima de 50 °C. No *setting*, as ligações iónicas, ou seja, as pontes salinas, são importantes na estabilização de rede proteica dos géis, em que as ligações se estabelecem entre os aminoácidos carregados das cadeias proteicas (COO⁻ e NH₃⁺). Também as ligações por pontes de hidrogénio são importantes, uma vez que estabilizam a estrutura secundária de tipo α-hélice das proteínas (Niwa, 1992).

Durante esta etapa, o desdobramento lento das estruturas proteicas por efeito da temperatura necessita que os aminoácidos hidrófobos estejam expostos à superfície, possibilitando a formação de ligações hidrófobas entre as moléculas de proteína igualmente desdobradas. A formação destas ligações é favorecida pelo aumento da temperatura pelo menos até aos 58 °C, tratando-se por isso de ligações de extrema importância durante esta etapa. Ao invés, as ligações por pontes de hidrogénio, não são favorecidas pelo aumento da temperatura (Lanier *et al.*, 2005)

É também durante o *setting* que ocorre a ação enzimática da transglutaminase (TGase), uma enzima constituinte da fração sarcoplasmática do músculo do peixe e que está envolvida na polimerização das cadeias pesadas de miosina. A TGase é preponderante na formação do gel e nas respectivas propriedades viscoelásticas (Lanier *et. al.*, 2005).

2.2.2.2.5. Aquecimento

Após o *setting*, se o *suwari* for sujeito a temperaturas superiores a 50 °C, pode degradar-se parcialmente e, a temperaturas próximas dos 60 °C parte da estrutura do gel é irreversivelmente destruída, o que tem implicações na textura, tornando-o frágil e quebradiço. Quando ocorre esta degradação, o produto resultante denomina-se por *modori* (Mendes, 2001).

Contudo, se ao sol de actiomiosina for aplicado um tratamento térmico direto a temperaturas elevadas (90 °C), dá-se uma agregação rápida, que origina um gel tipo *kamaboko* (“produto resultante da cozedura do *surimi* com sal e condimentos” -, Suzuki, 1987), de características pouco elásticas e mais friáveis. Uma vez que este tipo de aquecimento direto se realiza de forma bastante rápida, o processo de coagulação é mais intenso e o gel obtido apresenta cor branca, maior opacidade, maior friabilidade, menor elasticidade e baixa capacidade de retenção de água (Mendes, 2001).

Os géis do tipo *kamaboko* originados por uma fase inicial de *setting* seguido de tratamento térmico a 90 °C permitem obter géis de qualidade superior, visto existir uma combinação adequada de elasticidade e resistência (Mendes, 2001).

2.2.3. Interação proteína-lípidos e proteína-gases

2.2.3.1. Capacidade de emulsificação

As proteínas têm a capacidade de formar emulsões que, do ponto de vista físico, são dispersões de pequenas gotas de líquido numa fase contínua de um líquido imiscível com o material das gotas. No caso dos alimentos, a fase contínua é a água, enquanto a fase dispersa é de natureza lipídica (Sikorski, 2001).

A capacidade de emulsificação (EC) é afetada por características físico-químicas das proteínas, como a hidrofobicidade, a carga, a elasticidade-rigidez, a viscosidade da solução e a solubilidade. Por exemplo, quanto maior a solubilidade das proteínas na fase dispersa, maior a eficiência da emulsificação (Sikorski, 2001).

2.2.3.2. Capacidade de formação de espuma

A espuma é um importante critério de qualidade de muitos produtos alimentares, visto que é responsável por lhes conferir uma textura desejável. A espuma não é mais do que uma dispersão de bolhas de gás numa fase contínua líquida ou numa fase semi-sólida composta por água, proteínas, lípidos e outras macromoléculas. Na maioria dos produtos alimentares, a formação de espuma deve-se a processos fermentativos, como no caso da cerveja, ou então à incorporação de ar na matriz, prática usual em produtos de panificação (Sikorski, 2001).

A eficiência das proteínas como agentes formadores de espuma depende dos fatores que afetam a migração das moléculas para a interface e da capacidade das proteínas em formarem fortes filmes viscoelásticos à volta das bolhas de gás. A capacidade de formação de espuma (FC) é medida pelo aumento do volume das soluções proteicas após incorporação de ar, estando a estabilidade e a força da espuma dependentes da flexibilidade e da força mecânica do filme proteico. Também a presença de sais, açúcares e lípidos afetam a estabilidade e força da espuma. As espumas se não ficarem fixas pela ação do calor na rede proteica podem sofrer destabilização por drenagem do líquido devido à ação da gravidade, pressão ou evaporação através da coalescência das bolhas resultante da rutura dos filmes proteicos, ou através da difusão do gás, levando à formação de bolhas de ar cada vez maiores (Sikorski, 2002).

2.3. Recuperação de proteínas através da solubilização/precipitação no ponto isoelétrico

A recuperação de proteínas através da solubilização/precipitação no ponto isoelétrico (pI) foi proposta por Hultin e Kelleher (1999). Assim, em primeira instância, é a solubilidade das proteínas do músculo do peixe que condiciona este processo (Gehring *et al.*, 2010).

A solubilização das proteínas do músculo pressupõe a adição de um ácido ou de uma base à solução. Na solubilização ácida, o ácido dissocia-se fornecendo hidrogeniões (H_3O^+) à solução e as proteínas adquirem carga positiva devido à protonação dos aminoácidos básicos. Na solubilização alcalina, a adição de uma base (OH^-) à solução provoca a desprotonação dos aminoácidos ácidos, tornando as proteínas negativamente carregadas (Hultin *et al.*, 2005). O aumento da carga das proteínas faz intensificar as interações proteína-água, permitindo assim a sua solubilização.

A precipitação das proteínas ocorre quando se ajusta o pH das proteínas solubilizadas a valores próximos do seu *pI*. O ponto isoeletrico é uma característica específica das proteínas, uma vez que depende da respetiva composição de aminoácidos. No *pI* as interações electrostáticas proteína-proteína intensificam-se e as interações proteína-água são mais limitadas, levando à precipitação das proteínas. O *pI* corresponde por isso ao mínimo de solubilidade das proteínas, sendo comum estabelecer-se a curva de solubilidade em função do pH para determinar a solubilização/ precipitação isoeletrica das proteínas. (Gehring *et al.*, 2010). Na figura 1 esquematizam-se as interações entre as proteínas e a água no processo de recuperação de proteínas por solubilização ácida ou alcalina no *pI*.

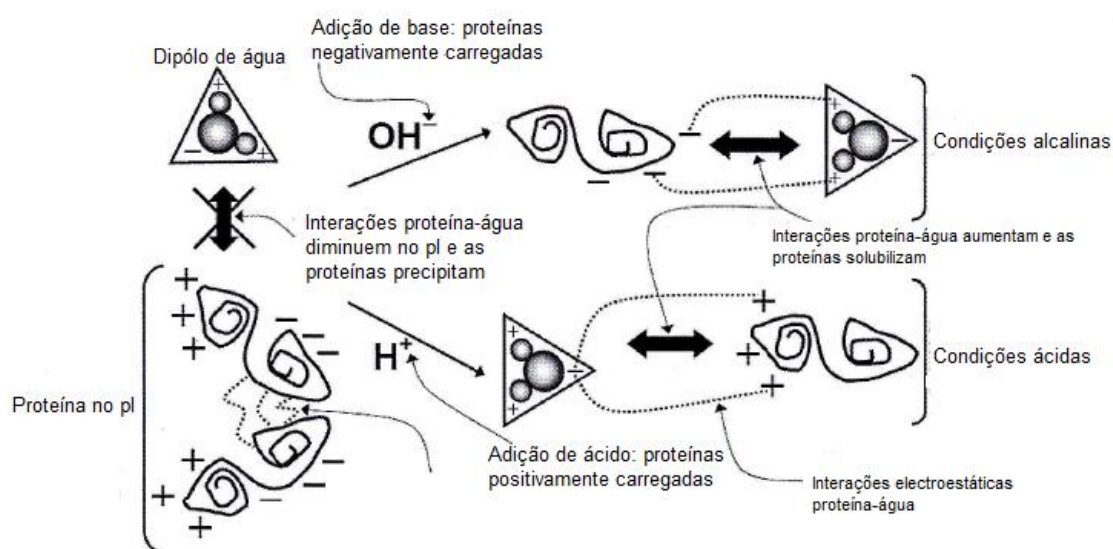


Figura 1 - Interações entre as proteínas e a água no processo de recuperação de proteínas por solubilização ácida ou alcalina no ponto isoeletrico (adaptado de Jaczynski, 2008).

A recuperação de proteínas através da solubilização/ precipitação isoeletrica tem um rendimento da ordem de 42-90 % a partir do material de partida, em contraste com um rendimento de cerca de 20 % caso se utilize o processo tradicional de *surimi* (Gehring *et al.*, 2010).

2.3.1. Processo

O *pI* das proteínas do músculo do pescado é cerca de 5,5, quer isto dizer que as proteínas precipitam a valores de pH aproximadamente 5,5 e tornam-se gradualmente mais solúveis em água à medida que o pH se torna mais ácido ou mais alcalino (Jaczynski, 2008).

Na recuperação de proteínas através da sua solubilização/precipitação isoeletrica, consideram-se geralmente cinco etapas (Jaczynski, 2008):

A primeira etapa consiste na homogeneização, ou moagem da matéria-prima com água, numa relação usual de 1:6 (peixe:água), de forma a reduzir as dimensões do material e deste modo facilitar a solubilização (Jaczynski, 2008).

Na segunda etapa, as proteínas são solubilizadas com adição de um ácido ou de uma base à solução (Hultin *et al.*, 2005). Tal como referido anteriormente, o aumento da carga das proteínas faz intensificar as interações proteína-água e diminuir as interações electrostáticas proteína-proteína, permitindo a sua solubilização na água.

Na terceira etapa procede-se à centrifugação das proteínas solubilizadas para se conseguir separá-las do material insolúvel. É usual a formação de quatro camadas: uma camada superior lipídica; uma camada aquosa, onde se encontram as proteínas solúveis; uma camada inferior, o sedimento, constituída por material insolúvel (membranas, proteínas insolúveis, ossos, espinhas, escamas, etc.) e uma camada gelatinosa situada acima do sedimento e entre a camada aquosa. Este sedimento gelatinoso é constituído por cerca de 98 % de água e a quantidade formada desta camada depende da concentração de proteína, do pH e das espécies usadas como matéria-prima. Devido à sua constituição, é um gel muito fraco que normalmente colapsa quando se retira a fase aquosa (Hultin *et al.*, 2005).

A precipitação ocorre na etapa seguinte através do ajuste de pH ao pI das proteínas solubilizadas (Jaczynski, 2008).

Por último, a suspensão das proteínas precipitadas é centrifugada, obtendo-se duas frações: uma que sedimenta, constituída pelas proteínas isoladas e outra aquosa, o sobrenadante, com água e compostos solúveis (Hultin *et al.*, 2005). Este sobrenadante pode ser reciclado sendo novamente utilizada num novo processo de recuperação isoelétrica de proteínas (Jaczynski, 2008).

De acordo com Hultin *et al.* (2005), o processo de solubilização ácida permite obter uma taxa de recuperação de proteínas superior à da solubilização alcalina (Gehring *et al.*, 2010), como se demonstra na tabela 2.

Tabela 2 - Rendimento da recuperação de proteínas por solubilização/ precipitação isoeletrica de proteínas a diferentes pH (Jaczynski, 2008).

pH (solubilização/ precipitação)	Recuperação de proteínas (%)
2,5/5,5	89,0
2,5/5,0	81,9
2,5/6,0	85,9
2,0/5,5	91,3
3,0/5,5	86,2
12,5/5,5	84,4
12,5/5,0	77,7
12,5/6,0	83,4
12,0/5,5	82,9
13,0/5,5	88,1

2.4. Os lípidos no pescado

O teor de gordura no pescado varia consoante a espécie, a idade, a época de desova, a dieta alimentar e a parte do corpo. Quanto maior o teor de humidade no peixe, menor o teor em gordura, ou seja, quanto mais água estiver presente no músculo do peixe, menor será o teor lipídico (Jaczynski, 2008).

É no músculo escuro que existe uma maior percentagem de lípidos, ao invés do que ocorre no músculo claro, o que implica maior propensão à oxidação e desenvolvimento de odores indesejáveis (cheiro a ranço). Os lípidos podem agrupar-se em dois grandes grupos: o dos compostos polares, de que fazem parte os fosfolípidos e o dos compostos apolares, que incluem os triacilgliceróis.

2.4.1. Fosfolípidos

Para além do seu valor tecnológico, é-lhes reconhecido um elevado valor nutricional e uma atividade comprovada ao nível antibacteriano, antiviral e anticancerígeno (Dumay *et al.*, 2006). Trata-se de um componente das membranas celulares, constituído também por uma molécula de glicerol. Contudo, apenas são constituídos por dois ácidos gordos, ligados também por pontes éster à molécula de glicerol, e por um grupo fosfato positivamente carregado (Jaczynski, 2008), como se observa na figura 2.

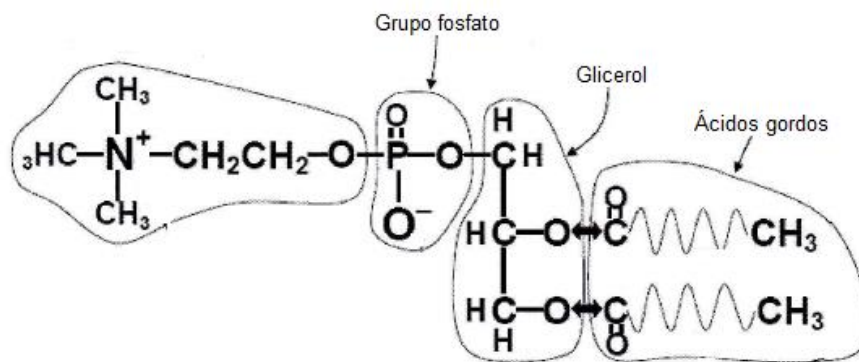


Figura 2 - Estrutura química dos fosfolípidos (adaptado de Jaczynski, 2008).

Devido à carga, os fosfolípidos podem atuar como compostos anfifílicos, ou seja, têm uma parte polar e outra apolar, o que permite o estabelecimento de ligações hidrofóbicas com substâncias apolares (ex. óleo de peixes) e, ao mesmo tempo, possibilita interações com água e/ou proteínas carregadas (ex. proteínas de peixe). Este comportamento faz dos fosfolípidos um exemplo de um agente emulsificante que dificulta por isso os processos de separação do óleo do peixe da água e das proteínas resultantes do processamento de produtos de pescado. Apesar do teor em fosfolípidos ser menor do que o teor em triacilgliceróis no músculo do peixe, contribuem mais para o desenvolvimento de processos de rancificação (Jaczynski, 2008).

A recuperação de proteínas através da solubilização/precipitação isoeletrica permite também a recuperação de lípidos e fosfolípidos, sendo mais eficiente em condições básicas (Gehring *et al.*, 2010). De acordo com Liang e Hultin (2005), o pré-tratamento da matéria-prima com ácido cítrico e iões cálcio durante o processo de solubilização aumenta a taxa de recuperação de lípidos. De acordo com os mesmos autores, os iões cálcio conseguem induzir a agregação ou fusão das membranas dos fosfolípidos. Apesar da taxa de recuperação de lípidos apolares (triacilgliceróis) ser bastante elevada recorrendo a este processo, o mesmo não ocorre na recuperação de fosfolípidos (Gehring *et al.*, 2010).

2.5. Propriedades texturais e reológicas dos géis

A determinação de propriedades texturais e reológicas de alimentos, neste caso de alimentos gelificados, é possível devido ao uso de métodos instrumentais, que se dividem em três classes distintas: testes empíricos, testes fundamentais e testes imitativos (Kim *et al.*, 2005).

2.5.1. Testes empíricos

Num teste empírico, a resposta da amostra depende da sua composição, estrutura e das condições do teste, nomeadamente do tipo e velocidade da sonda e da distância e geometria da amostra. (Kim *et al.*, 2005). São testes mais simples e rápidos do que os testes fundamentais, mas apresentam resultados comparativamente menos precisos (Kim *et al.*, 2005).

Consideram-se como testes empíricos os testes de penetrometria e os testes de compressão/relaxação. Neste trabalho recorreu-se apenas a um tipo de teste empírico, o teste de penetrometria, sendo por isso aquele que se descreve de seguida.

2.5.1.1. Testes de penetrometria

É um teste muito utilizado na indústria do *surimi* para avaliar a força (ou rigidez) do gel, simulando as grandes deformações que ocorrem durante a mastigação (Kim *et al.*, 2005). Foi inicialmente desenvolvido por Matsumoto e Arai (1952) e posteriormente modificado por Okada e Yamazaki (1958) (Kim *et al.*, 2005).

Neste teste, utiliza-se uma sonda com diâmetro e comprimento específico para comprimir a superfície do gel a uma taxa de deformação constante (10-60 mm/min) até que a rutura ocorra. Normalmente na indústria recorre-se a uma taxa de deformação de 60 mm/min e a uma sonda esférica com 5 mm de diâmetro (Kim *et al.*, 2005). Como resultado deste teste obtêm-se umas curvas semelhantes às da figura 3, em que as propriedades do gel analisado são definidas pela força de rutura (F_0), em *kN* ou *g*, e pela deformação à rutura (D_1) em *mm* ou *cm*, respetivamente. No entanto, é mais utilizado o produto dos dois parâmetros anteriormente mencionados, que se designa por força do gel (*kN x mm*), que se explica como sendo o trabalho necessário para que a rutura ocorra (Pires, 2008).

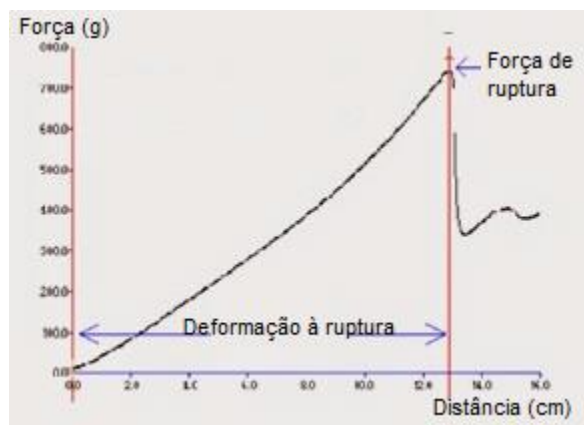


Figura 3 - Representação esquemática do perfil típico de um teste de penetrometria.

2.5.2. Testes fundamentais

Estes testes produzem resultados teoricamente independentes da geometria da amostra a analisar e do instrumento utilizado na análise, sendo por isso os mais indicados quando o objetivo é a realização de ensaios reológicos para definir a estrutura dos géis (Kim *et al.*, 2005).

2.5.2.1. Testes reológicos

Estes testes são utilizados para analisar o comportamento reológico dos materiais, ou seja, estudar a deformação e o escoamento dos materiais.

Os testes reológicos são um dos tipos de testes fundamentais que permitem perceber a variação da tensão e da deformação de um material ao longo do tempo. Estes testes podem ser oscilatórios, que se realizam em regime dinâmico, ou estáticos. Neste trabalho apenas se sujeitaram os géis de proteínas recuperadas aos testes oscilatórios.

2.5.2.2. Testes oscilatórios

Nos testes oscilatórios, também chamados de testes em regime dinâmico, a amostra é analisada de forma não destrutiva. A amostra é colocada entre um prato fixo inferior e um sistema de medida superior (cone ou prato) móvel, cujo eixo é perpendicular ao plano do prato, e sujeita a uma variação sinusoidal da tensão (ou deformação), registando-se uma deformação como resposta. Estes testes realizam-se a baixas tensões para não provocarem alterações na estrutura dos materiais. A tensão aplicada deverá estar no intervalo da zona viscoelástica linear, ou seja, na zona em que a razão entre a tensão e deformação, em qualquer tempo ou frequência, seja independente da magnitude da tensão aplicada (Pires, 2008).

O comportamento dos materiais é então caracterizado pelo módulo complexo dinâmico (G^*), expresso como a razão entre a tensão e a deformação, de acordo com a expressão:

$$G^* = G' + i G''$$

O módulo de conservação G' mede a energia que é conservada e posteriormente utilizada na recuperação da deformação quando a tensão é removida, refletindo a contribuição elástica do material. Já G'' é denominado como módulo de dissipação e mede a energia aplicada ao material que é dissipada no escoamento para vencer o atrito interno, refletindo deste modo a contribuição viscosa (Sousa, 2001).

É possível realizar vários tipos de testes dinâmicos consoante o varrimento for realizado em tensão, frequência, tempo ou temperatura. O teste de varrimento de tensão é o mais utilizado para a determinação do intervalo de viscoelasticidade linear, ou seja, para determinar a região em que G' e G'' se mantêm constantes à medida que a amplitude da tensão ou deformação aumenta para uma dada frequência. Deste modo, obtém-se como resultado a tensão ou deformação máxima que é possível aplicar ao material sem que ocorra rutura da estrutura interna do material (Alves, 2003)

2.5.3. Teste imitativos

Estes testes imitam as condições a que os alimentos estão sujeitos durante a mastigação, mas normalmente apresentam resultados difíceis de interpretar e comparar. Desta categoria de testes fazem parte o teste TPA e os ensaios realizados com células de Kramer e Warner-Bratzler (Kim *et al.*, 2005).

2.5.3.1. Análise de perfil de textura (TPA)

Também designado por teste das duas dentadas, envolve duas compressões sucessivas do material com uma sonda, separadas por um tempo de espera entre elas. A compressão utilizada deverá corresponder a cerca de 75 % da altura da amostra (Kim *et al.*, 2005). Como resultado deste teste surge uma curva força vs. tempo, semelhante à representada na figura 4, onde os vários parâmetros de textura podem ser correlacionados com os resultados da análise sensorial da amostra analisada (Kim *et al.*, 2005).

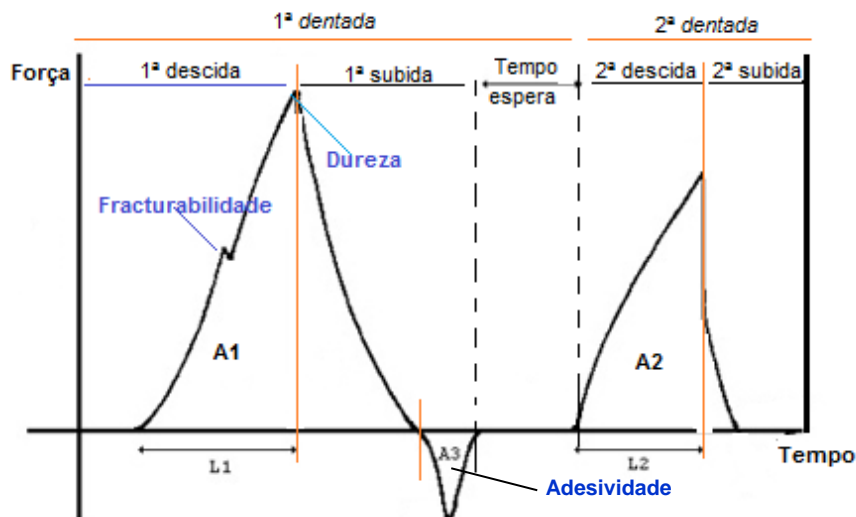


Figura 4 - Representação esquemática do perfil típico de um teste TPA.

O texturograma obtido como resultado de um teste TPA permite obter diretamente os seguintes parâmetros de textura para um dado material:

- **Dureza:** força máxima (kN) medida na primeira compressão (primeira “dentada”), que indica a resistência máxima do material nas condições utilizadas. Tratando-se de materiais gelificados, a força máxima relaciona-se com a força do gel (Kim *et al.*, 2000)
- **Fracturabilidade:** força (kN) à qual se verifica a fratura da amostra, correspondendo à força do primeiro pico durante a primeira compressão;
- **Coesividade:** parâmetro adimensional dado pela razão entre a área do segundo ciclo de compressão (A_2) e a área do primeiro ciclo (A_1). Amostras muito coesas são percebidas na boca como duras e difíceis de quebrar (Nunes, 2003);
- **Adesividade:** propriedade de alguns materiais com características aderentes. Define-se como a resistência do material ao retrocesso da sonda, sendo dado pela área negativa do texturograma (A_3), indicando por isso o trabalho necessário para remover a sonda do interior da amostra (Raymundo, 2003). É um parâmetro calculado por integração da área negativa e dado em unidades de trabalho ou energia (N.s);
- **Springiness** (“elasticidade”): é um parâmetro adimensional obtido pelo quociente entre o comprimento L_1 e o comprimento L_2 e mede a distância que o material recupera em altura, entre o fim do primeiro ciclo e o início do segundo ciclo. Também pode ser definida com uma medida da destruição da estrutura inicial da amostra (Szczesniak, 2002).

A gomosidade e a mastigabilidade são outros dois parâmetros de textura, mas que são calculados a partir dos parâmetros obtidos diretamente:

- **Gomosidade:** produto da firmeza pela coesividade (N);
- **Mastigabilidade:** produto da gomosidade pela *springiness* (N).

PARTE III - MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

A matéria-prima usada neste trabalho foi cedida pela ETSA, Proteína e Energia, especialistas na gestão de subprodutos de origem animal. A matéria-prima era constituída por uma mistura de espécies de peixes congelados recolhidos de vários centros de retalho alimentar a nível nacional. As misturas de peixes rececionadas foram mantidas em congelado até à sua utilização no processo de recuperação de proteínas. Foram utilizadas misturas de peixes diferentes na recuperação ácida e na recuperação alcalina de proteínas, as quais se indicam na tabela 3.

Tabela 3- Espécies de peixes nas misturas usadas como matéria-prima na recuperação ácida e alcalina de proteínas.

Tipo de processo de recuperação de proteínas	ÁCIDA	ALCALINA
Espécies de peixes na matéria-prima	Faneca (<i>Trisopterus luscus</i>), tamboril (<i>Lophius budegassa</i>), carapau (<i>Trachurus trachurus</i>), pescada (<i>Merluccius spp.</i>), verdinho (<i>Micromesistius poutassou</i>), peixe-espada (<i>Aphanopus carbo</i>), robalo (<i>Dicentrarchus labrex</i>), perca (<i>Lates calcarifer</i>), besugo (<i>Pagellus acarne</i>), esparídeos, sargo (<i>Diplodus spp.</i>), pargo-mulato (<i>Plectorhinchus mediterraneus</i>), cantarilho (<i>Helicolenus dactylopterus</i>), salongo (<i>Beryx splendens</i>), solha (<i>Pleuronectes platessa</i>), linguado (<i>Solea vulgaris</i>), pregado (<i>Psetta maxima</i>), corvina (<i>Argyrosomus regius</i>)	Pargo-mulato (<i>Plectorhinchus mediterraneus</i>), salmão (<i>Salmo salar</i>), tamboril (<i>Lophius budegassa</i>), cantarilho (<i>Helicolenus dactylopterus</i>), solha (<i>Pleuronectes platessa</i>), carapau (<i>Trachurus trachurus</i>), pescada (<i>Merluccius spp.</i>), peixe-espada (<i>Aphanopus carbo</i>), perca (<i>Lates calcarifer</i>)

As misturas de peixes congelados foram moídas inteiras num moinho de carne Hobart 4B22 (ITW Food Equipment Group, EUA) e após a moagem foram divididas em porções e conservadas congeladas até à sua utilização.

3.2. Recuperação de proteínas por solubilização ácida e alcalina

O processo de recuperação ácido e alcalino de proteínas utilizado foi o proposto por Hultin e Kelleher (1999) e por Hultin e Kelleher (2000a), respetivamente, o qual se representa na figura 5. Para a recuperação de proteínas, a matéria-prima foi homogeneizada com água num tanque com agitação na relação 1:6 (peixe:água). Na recuperação alcalina de proteínas, utilizaram-se 3520 g de peixe moído e ajustou-se o tanque com água a 21 L, enquanto na recuperação ácida foram utilizadas 2850 g de peixe moído e ajustado o tanque com 17 L de água. A homogeneização do peixe moído com água foi feita com um homogeneizador Robot Coupe MP450 Combi (Robot Coupe, França). Após a homogeneização, as proteínas foram solubilizadas ajustando o pH da suspensão obtida a pH 11 com adição de NaOH 2 M no caso da solubilização alcalina e, na solubilização ácida a pH 2 com HCl 2 M. A medição do pH foi feita com o equipamento HI 221 Calibration Check Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, Itália).

O homogeneizado foi seguidamente centrifugado numa centrífuga contínua West Falia Separator (GEA, Alemanha), que permitiu a separação das proteínas solubilizadas (fração aquosa) do material insolúvel constituído essencialmente por espinhas, peles e escamas.

A precipitação das proteínas solubilizadas foi realizada no tanque de agitação ajustando o pH a 5,5. As proteínas precipitadas foram recolhidas por centrifugação, congeladas e liofilizadas.

As proteínas recuperadas por solubilização alcalina foram designadas por PR_ALC e as proteínas recuperadas por solubilização ácida por PR_AC.

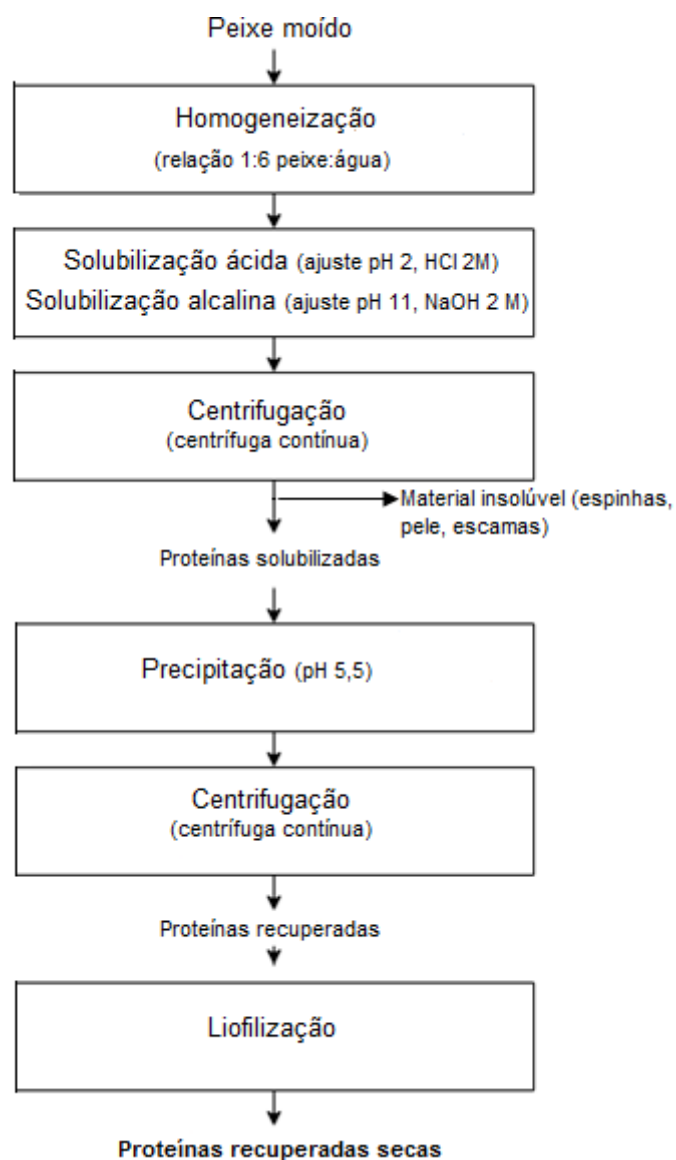


Figura 5 - Processo de recuperação de proteínas por solubilização ácida e alcalina, de acordo com o método descrito por Hultin e Kelleher (1999) e por Hultin e Kelleher (2000), respetivamente.

3.3. Remoção dos fosfolípidos das proteínas solubilizadas

3.3.1. Efeito do tratamento com cloreto cálcio e ácido cítrico

O efeito do tratamento com cloreto de cálcio (CaCl_2) e ácido cítrico na remoção dos fosfolípidos realizou-se de acordo com Liang e Hultin (2005).

Nos ensaios de remoção dos fosfolípidos das proteínas solubilizadas a pH ácido com a relação 1:9 (peixe água) utilizaram-se as seguintes concentrações de CaCl_2 e ácido cítrico:

-5 mM de ácido cítrico e: 0 mM; 1 mM; 2 mM; 5 mM; 8 mM; 10 mM; 20 mM; 30 mM e 50 mM de CaCl_2 ;

- 8 mM de CaCl_2 e: 0 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 3 mM; 5 mM; 6 mM; 8 mM e 10 mM de ácido cítrico.

A sequência de operações seguidas nestes ensaios está esquematizada na figura 6.

Pesou-se 50 g de peixe moído para um copo e adicionou-se 450 mL de água e homogeneizou-se no Polytron PT 3100 (Kinematica, Suíça) a 10000 rpm, durante 1 minuto. De seguida, as proteínas foram solubilizadas a pH 2, sempre com agitação mecânica. As proteínas solubilizadas foram depois centrifugadas a 13100 g durante 20 minutos à temperatura de 5 °C na centrífuga Kubota 6800 (Kubota, Japão).

Após a centrifugação, o volume total de sobrenadante obtido foi dividido em duas frações iguais: uma das frações foi sujeita ao tratamento, sendo que a outra foi recolhida e liofilizada, correspondendo à fração sem tratamento. Na outra fração procedeu-se ao tratamento com as diferentes concentrações de CaCl_2 e ácido cítrico anteriormente indicadas, durante 1 hora sob agitação num agitador magnético. Findo esse período, o sobrenadante foi centrifugado nas condições anteriores, recuperado e liofilizado, correspondendo à fração com tratamento.

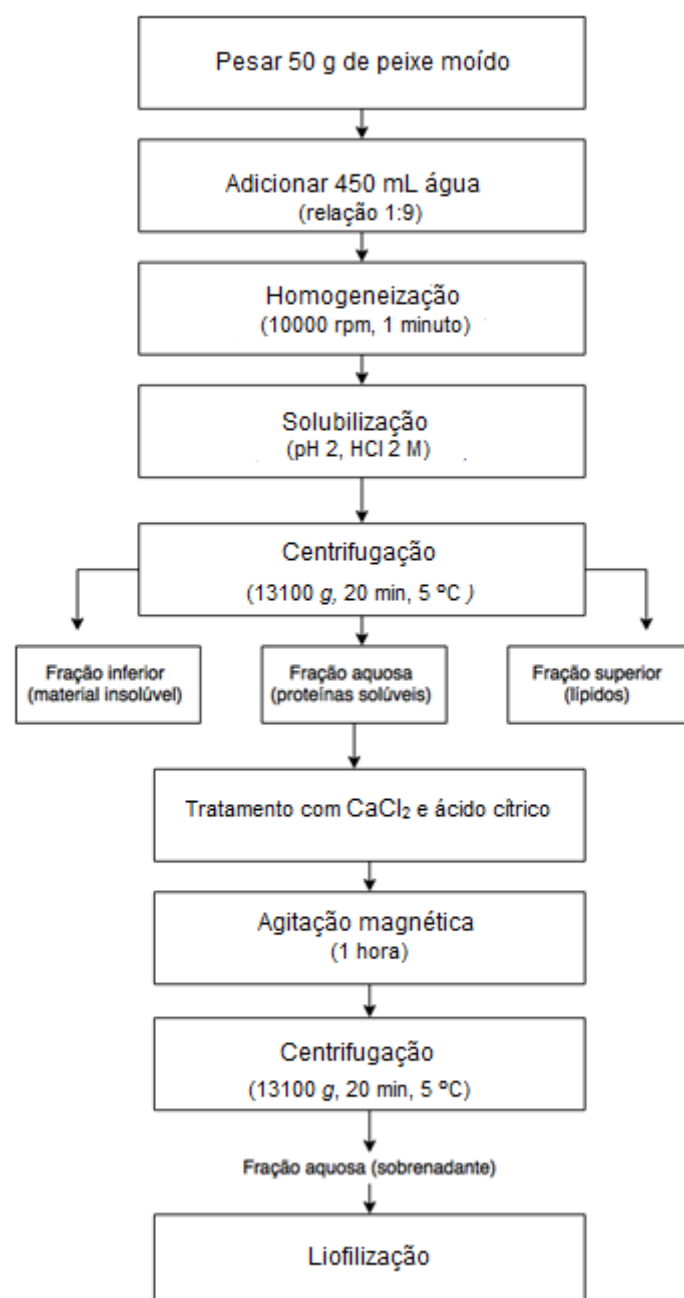


Figura 6 - Procedimento utilizado para avaliar o efeito do tratamento com CaCl_2 e ácido cítrico na remoção de fosfolípidos de acordo com o descrito por Liang e Hultin (2005).

3.3.2. Efeito da relação peixe:água

Para testar o efeito da relação peixe:água na solubilização ácida na remoção de fosfolípidos utilizou-se uma concentração de 8 mM de CaCl_2 e 5 mM de ácido cítrico no tratamento e as relações 1:6 e 1:9 (peixe:água), de acordo com o procedimento da figura 7.

Pesou-se 250 g de peixe moído e adicionou-se água de acordo com as razões indicadas. A homogeneização da matéria-prima, o ajuste de pH e a centrifugação decorreram nas condições referidas no ponto 3.3.1.

Após a primeira centrifugação obtiveram-se três frações, tendo-se congelado separadamente a totalidade da fração insolúvel e da emulsão e cerca de 20% da fração solúvel para posterior liofilização. Ao volume remanescente da fração solúvel adicionou-se CaCl_2 8 mM e ácido cítrico 5 mM e manteve-se a solução em agitação durante 1 hora.

Após este período, a solução foi centrifugada durante 20 minutos obtendo-se de novo três fases. Tal como anteriormente, recuperaram-se na totalidade a fração insolúvel e a emulsão e parte do volume das proteínas solubilizadas. Ao volume restante das proteínas solubilizadas ajustou-se o pH a 5,5 e as proteínas precipitadas foram depois recuperadas por centrifugação, congeladas e liofilizadas.

Todas as frações recolhidas foram posteriormente caracterizadas no que respeita ao teor de fosfolípidos.

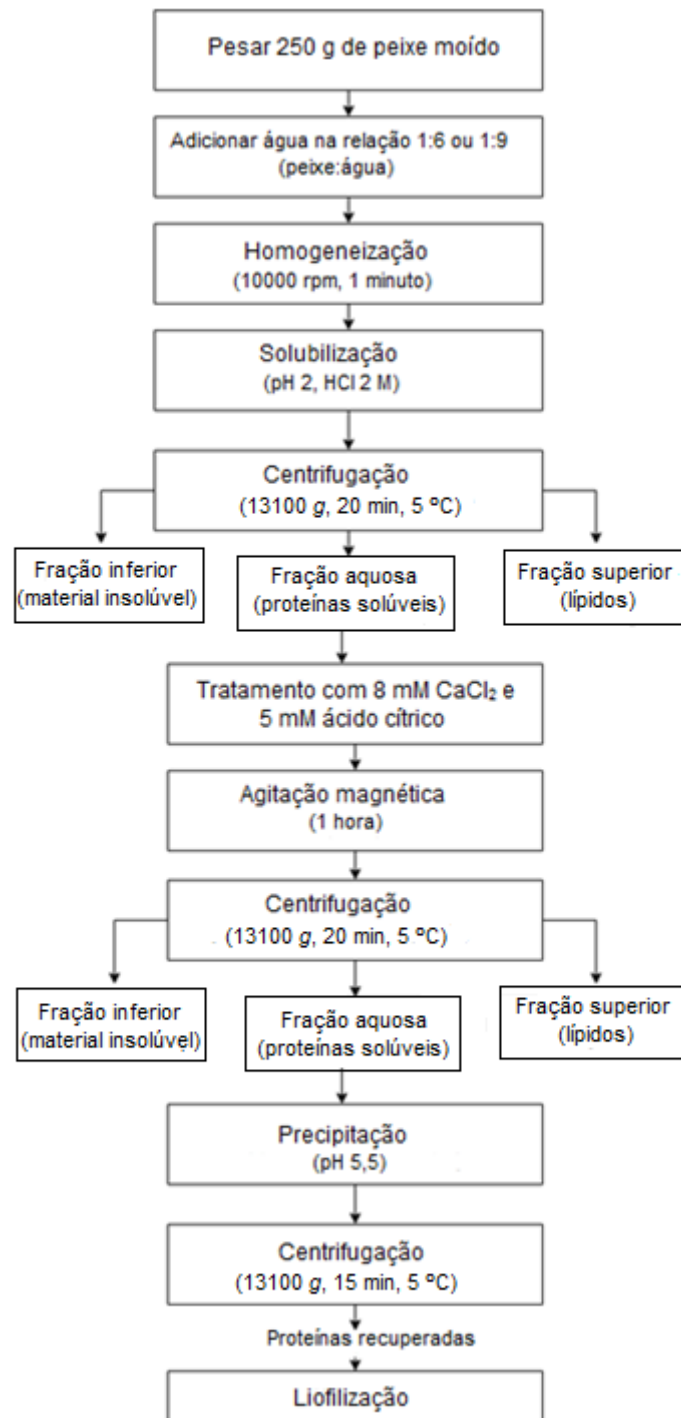


Figura 7 - Procedimento utilizado para avaliar o efeito da relação peixe:água na remoção de fosfolípidos.

3.3.3. Efeito do pH de solubilização

Para testar o efeito do tratamento com cloreto de cálcio e ácido cítrico na remoção dos fosfolípidos no processo de recuperação de proteínas por solubilização ácida e alcalina utilizou-se a relação 1:9 peixe:água e o tratamento com 8 mM de CaCl_2 e 5 mM de ácido cítrico, de acordo com a figura 7.

Em ambas as solubilizações pesou-se 250 g de peixe moído, adicionou-se 2250 mL de água e homogeneizou-se. No caso da solubilização ácida, o ajuste de pH foi feito com HCl 2 M até pH 2 e na solubilização alcalina ajustou-se o pH com NaOH 2M até pH 11. A solubilização, centrifugação, tratamento e precipitação das proteínas decorreram da mesma forma que o descrito em 3.3.2.

Todas as frações recolhidas durante este processo foram também caracterizadas no que respeita ao teor de fosfolípidos.

3.4. Composição química e fosfolípidos

3.4.1. Humidade

A determinação do teor de humidade das amostras de matéria-prima (peixe-moído) e proteínas recuperadas foi realizada por diferença de peso de acordo com o procedimento técnico de métodos analíticos seguido pelo IPMA, baseado na norma portuguesa NP 2282 (2009).

Para a determinação da humidade da matéria-prima pesaram-se 10 g de amostra (peixe moído) e nas proteínas recuperadas secas pesou-se 2 g de amostra. O procedimento foi feito em triplicado.

As amostras foram pesadas para um cadinho e secas em estufa a 100 °C durante uma noite. No dia seguinte, os cadinhos foram retirados da estufa e arrefecidos em exsiccador durante 30 minutos.

Os resultados da humidade do produto, expressa em grama por 100 g de amostra é dada pela expressão:

$$100 - [(m_3 - m_1) / m_2 \times 100]$$

Em que:

m_1 – massa (g) do cadinho

m_2 – massa (g) da toma para análise

m_3 – massa (g) do cadinho e da toma, após secagem

3.4.2. Gordura livre

O doseamento da gordura nas amostras de matéria-prima (peixe-moído) e de proteínas recuperadas por solubilização ácida e alcalina foi efetuado de acordo com a norma portuguesa para produtos da pesca e da aquicultura NP 1972 (2009).

Para as amostras de peixe moído pesaram-se 10 g e para as amostras de proteínas recuperadas secas pesaram-se 2 g. O procedimento foi feito em duplicado.

Adicionou-se uma quantidade de sulfato de sódio anidro igual à quantidade de amostra e transferiu-se para o cartucho de extração, arrastando todos os vestígios de amostra com algodão, que se introduziu igualmente no cartucho. Colocou-se no aparelho de extração.

Num balão previamente seco em estufa durante 1 hora, arrefecido em exsicador e tarado, foi colocado um volume de éter (solvente) igual a duas vezes a capacidade do extrator. O aparelho de extração foi depois aquecido em placa durante 7 horas.

Após a extração, o balão foi retirado e eliminou-se o solvente por destilação. O balão com o extrato foi depois seco em estufa durante 1 hora, arrefecido em exsicador e pesado. Estas operações de aquecimento, arrefecimento e pesagem do balão foram repetidas até que duas pesagens sucessivas não diferissem entre si em mais de 0,1 % da massa da amostra.

Os resultados do teor de matéria gorda total, expresso em grama (g) por 100 g de amostra são dados pela seguinte expressão:

$$(m_3 - m_2) \times (100/m_1)$$

Em que:

m_1 – massa (g) da amostra

m_2 – massa (g) do balão de extração

m_3 – massa (g) do balão de extração com o extrato após secagem.

3.4.3. Proteína total

3.4.3.1. Determinação da proteína pelo método de Dumas

A determinação da proteína bruta da matéria-prima (peixe-moído) e das proteínas recuperadas por solubilização alcalina foi efetuada pelo método de Dumas descrito por Saint-Denis e Goupy (2004), usando o equipamento LECO protein/ nitrogen analyser FP-528 (LECO Corp., EUA).

Para a determinação da proteína pesou-se cerca de 150 mg de cada amostra, que depois foram colocadas no equipamento. Neste procedimento, realizado em duplicado, o azoto total é determinado por combustão. O resultado em azoto é multiplicado pelo fator de conversão 6,25, obtendo-se deste modo o teor em proteína bruta.

3.4.3.2. Determinação da proteína pelo método de Kjeldahl

Na determinação de proteína bruta da matéria-prima (peixe-moído) e proteínas recuperadas por solubilização ácida, por impossibilidade técnica de recorrer ao equipamento LECO, optou-se pelo método de Kjeldahl, de acordo com o descrito no AOAC (1998).

Para a realização deste método pesou-se 0,5 g de cada amostra, em triplicado. Depois de pesadas, as amostras foram colocadas em tubos de Kjeldahl. Em cada tubo adicionou-se 10 mL de H₂SO₄ concentrado e cerca de 0,5 g de catalisador (mistura de CuSO₄ e K₂SO₄ na proporção 10/90). Os tubos de Kjeldahl foram colocados no digestor, iniciando-se a digestão a 100 °C, com um aumento progressivo da temperatura até 350 °C que foi mantida até 2-2,5 horas, até se obter um líquido xaroposo incolor. Este líquido foi depois transferido quantitativamente com um funil para um balão volumétrico de 250 mL. Após arrefecimento do balão, ajustou-se o volume com água destilada. Para um Erlenmeyer de 100 mL mediu-se 50 mL de ácido bórico (H₃BO₃) a 4 % e adicionou-se 3 gotas de indicador misto (mistura de verde de bromocresol com vermelho de metilo). Adicionou-se 50 mL de NaOH a 40% à solução a analisar e iniciou-se a destilação no equipamento. No final da destilação foi recolhido cerca de 50 mL do destilado que depois se titulou com uma solução de HCl. 0.1 M

Os resultados são expressos em g de proteína por 100 g de amostra, que se obtém através da conversão do teor de azoto em teor de proteína utilizando o fator de conversão 6,25.

3.4.4. Cinza

A determinação do teor de cinza total das amostras seguiu-se o procedimento técnico de métodos analíticos do IPMA, com base no descrito na norma portuguesa NP 2032 (2009), excetuando o passo de carbonização, que foi feito no forno de mufla a 550 °C.

Nesta determinação, os cadinhos com a toma após secagem na estufa durante uma noite a 100°C, foram colocados na mufla à temperatura inicial de 200 °C. A temperatura foi aumentada gradualmente até 500 °C e os cadinhos mantidos a esta temperatura durante uma noite.

No dia seguinte, os cadinhos foram retirados da mufla e arrefecidos em exsiccador. Depois do arrefecimento, pesaram-se os cadinhos e foram colocados na mufla a 500 °C durante 30 minutos. Findo este período, retiraram-se os cadinhos para arrefecimento em exsiccador e foram novamente pesados. Este procedimento foi repetido até que duas pesagens sucessivas não difiram entre si em mais de 1 mg.

Os resultados do teor de cinza são expressos em grama por 100 g de amostra, de acordo com a seguinte equação:

$$[(m_3 - m_1) / (m_2 - m_1)] \times 100$$

Em que:

m_1 – massa (g) do cadinho

m_2 – massa (g) do cadinho e da amostra

m_3 – massa (g) do cadinho e do resíduo

3.4.5. Determinação do teor de fosfolípidos

Para determinar o teor de fosfolípidos foi feita primeiro a extração da gordura seguindo o descrito no método de Folch (1956). O procedimento foi feito em quadruplicado.

Num tubo de ensaio pesou-se 100 mg de cada amostra liofilizada. Depois adicionou-se 3 mL da mistura clorofórmio+metanol na razão 2:1. Os tubos foram agitados a rotação baixa no *vórtex* e de seguida agitados em placa a 3500 rpm, durante 10 minutos. A cada tubo foi adicionado 3 mL de HCl (0,1 N) e 0,3 mL de $MgCl_2$ (0,5 %) e depois centrifugados a 2000 g a 20 °C durante 5 min.

Após a centrifugação, recolheu-se a fase orgânica e procedeu-se a uma segunda extração nas mesmas condições durante 5 minutos, seguida de centrifugação.

A fase orgânica foi retirada e adicionada à anteriormente recolhida e filtrada com sulfato de sódio anidro para tubos tarados, e o solvente evaporado sob corrente de azoto,

Os resultados são expressos em mg por 100 g de amostra liofilizada de acordo com a seguinte expressão:

$$[(m_3 - m_2) / m_1] \times 100$$

Em que:

m_1 – massa (g) da amostra

m_2 – massa (g) do tubo

m_3 – massa (g) do tubo após evaporação do solvente

Aos tubos com os extratos evaporados adicionou-se 1 mL de clorofórmio e conservou-se no frio para posterior utilização na determinação do teor em fosfolípidos. Nesta determinação seguiu-se o método descrito por Smedes (1999). Para cada amostra foi preparada uma solução de 0,5 mg gordura/ mL. De cada solução retirou-se 2 mL para um tubo, procedimento feito em triplicado. A cada tubo juntou-se 1 mL de reagente de tiocianato (mistura de cloreto férrico hexahidratado 0,1 M e tiocianato de amónio 0,4 M) e agitou-se no *vórtex* a rotação máxima durante 1 minuto. De seguida, retirou-se a fase aquosa e leu-se a absorvância a 488 nm no espectrofotómetro Unicam UV/Vis spectrometer (ThermoScientific, EUA). Cada determinação foi feita em triplicado.

O teor de fosfolípidos foi determinado nas amostras referidas anteriormente, nas proteínas recuperadas secas após tratamento com CaCl₂ e ácido cítrico e também nas frações obtidas após homogeneização do peixe moído com água nas proporções de 1:6 e 1:9, seguida de centrifugação.

Foi elaborada uma curva de calibração usando como padrão a fosfatidilcolina nas concentrações de 5 µg/ mL, 10 µg/ mL, 20 µg/ mL, 40 µg/ mL, 50 µg/ mL, 60 µg/ mL e 80 µg/ mL.

3.5. Propriedades funcionais das proteínas recuperadas

3.5.1. Capacidade de retenção de água/ gordura

A capacidade de retenção de água (WHC) e gordura (FA) foi determinada de acordo com o descrito por Choi *et al.* (2009). Para cada amostra fez-se 5 réplicas.

Para a determinação da capacidade de retenção de água pesou-se 1 g de amostra ao qual se adicionou 20 mL de água. Na determinação da capacidade de retenção de gordura foi pesada a mesma quantidade de amostra e adicionou-se 20 g de óleo vegetal.

As amostras foram homogeneizadas no Polytron a 8000 rpm durante 30 segundos. De seguida, as amostras foram deixadas à temperatura ambiente durante 20 minutos e no final desse período foram centrifugadas a 3000 g, durante 10 minutos e à temperatura ambiente. No final da centrifugação foi pesada a água e o óleo livre, respetivamente.

Os resultados destas determinações são expressos em grama por 100 g de amostra, de acordo com as seguintes expressões:

$$\text{WHC} = [m_1 - m_2] / m_3$$

$$\text{FA} = [m_1 - m_2] / m_3$$

Em que:

m_1 – massa água inicial (g) ou massa óleo inicial (g), respetivamente

m_2 – massa água livre (g) ou massa óleo livre (g), respetivamente

m_3 – massa da amostra (g)

3.5.2. Capacidade de formação da espuma

A capacidade de formação de espuma (FC) das proteínas recuperadas foi determinada de acordo com Diniz e Martin (1997). Preparou-se uma solução com 3 % de proteína e homogeneizou-se no agitador magnético. Dessa solução foram retiradas 8 alíquotas de 30 mL para provetas graduadas de 50 ou 100 mL. As alíquotas foram homogeneizadas no Polytron a 9500 rpm, durante 3 minutos. Após agitação registou-se o volume total (mL), o volume de líquido (mL) e o volume de espuma (mL). A capacidade de formação de espuma foi calculada como o volume de espuma formado após agitação (mL) por g de proteína de acordo com a expressão:

$$\text{FC} = [(V_T - V_L) / c] \times 100$$

Em que:

V_T – volume total (mL)

V_L – volume de líquido (mL)

c – concentração de proteína na amostra (g)

3.5.3. Estabilidade da emulsão

A estabilidade das emulsões preparadas com as proteínas recuperadas foi realizada de acordo com o método descrito por Kristinsson e Rasco (2000). O procedimento foi feito em quadruplicado.

Pesou-se 1 g de amostra, adicionou-se 100 mL de NaCl 0,1 M e 100 g de óleo vegetal e homogeneizou-se no Polytron a 13500 rpm, durante 2 minutos. A solução homogeneizada foi dividida por 3 provetas de 50 mL e deixadas à temperatura ambiente durante 15 minutos. No final foi medido o volume total e o volume da fase aquosa.

A estabilidade da emulsão (ES) foi determinada de acordo com a seguinte expressão, cujos resultados são expressos em percentagem (%):

$$ES = [(V_T - V_a) / V_T] \times 100$$

Em que:

V_T – volume total (mL)

V_a – volume fase aquosa (mL)

3.5.4. Índice de Atividade Emulsionante

O Índice de Atividade Emulsionante (EAI) foi determinado de acordo com o método de Pearce e Kinsella (1978), descrito por Balti *et al.* (2010).

Para cada amostra foram preparadas 4 soluções de 30 mL com 1 % de proteína. À cada solução adicionou-se 10 g de óleo e depois homogeneizou-se no Polytron a 8000 rpm, durante 30 segundos.

De cada solução retiraram-se 7 alíquotas de 50 μ L da emulsão e a cada alíquota adicionou-se 5 mL de SDS 0,1 % e agitou-se no *vórtex*. De seguida, foi feita a leitura de absorvância a 500 nm no espectrofotómetro.

Os resultados são expressos em m^2 por g, de acordo com a seguinte expressão:

$$EAI = [(2 \times 2,303 \times Abs) / 0,25 \times c]$$

Em que:

c – concentração de proteína (g/m^3)

3.5.5. Capacidade de gelificação das proteínas

3.5.5.1. Preparação dos géis tipo *kamaboko*

O procedimento usado na preparação dos géis tipo *kamaboko* com as proteínas recuperadas foi adaptado do descrito por Mendes (2001), que se apresenta na figura 8.

A partir das proteínas recuperadas, preparou-se uma solução com 17,5 % de proteína e 80 % de humidade. De seguida, ajustou-se o pH entre 6,5-7,0, adicionou-se 2,5 % de NaCl e homogeneizou-se a pasta resultante no equipamento Grindomix GM 200 (Retsh, Alemanha).

A pasta obtida foi colocada manualmente em cilindros metálicos, com altura e diâmetro de 3 cm, para se proceder ao seu tratamento térmico, durante 30 minutos a 35 °C, num banho de água (*setting*).

Após o *setting*, os cilindros metálicos foram colocados num cozedor a vapor a 90 °C durante 1 hora. Terminado o tratamento térmico, os géis foram arrefecidos numa mistura de gelo e água e armazenados a 4 °C durante a noite. No dia seguinte, as amostras dos géis foram desenformadas e mantidas à temperatura ambiente, para se proceder aos ensaios no texturómetro TA.XT plus (Stable Micro System, Reino Unido)

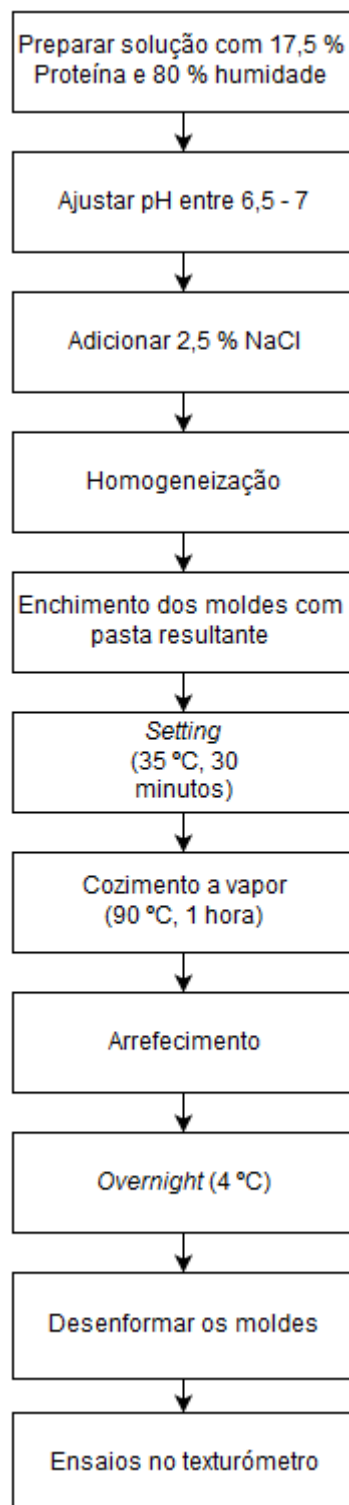


Figura 8 - Determinação da capacidade de gelificação das proteínas de acordo com Mendes (2001).

3.5.5.2 Avaliação da textura dos géis tipo *kamaboko*

As propriedades texturais dos géis obtidos através do procedimento da capacidade de gelificação foram analisadas no texturómetro, onde foram realizados testes de análise de perfil de textura (TPA) e testes de penetrometria. Todos os ensaios foram realizados à temperatura ambiente e com uma sonda esférica com 5 mm de diâmetro (sonda P/50). Os ensaios foram realizados com uma velocidade de teste (*test speed*) de 1 mm/s, com uma profundidade de penetração das amostras de 8 mm e com um intervalo de espera entre as “duas dentadas” de 5 segundos. A célula de carga utilizada foi de 100 N.

3.5.5.3. Avaliação do comportamento reológico dos géis tipo *kamaboko*

O comportamento viscoelástico linear dos géis de proteínas recuperadas foi determinado a partir de testes reológicos num reómetro de tensão controlada HAAKE MARS – Modular Advanced Rheometer System (ThermoScientific, EUA). Os testes foram feitos em triplicado.

A preparação das pastas dos géis foi feita *in situ* de acordo com o procedimento da capacidade de gelificação (3.5.5.1.). As amostras foram colocadas no reómetro que utiliza um sistema de sensor de pratos paralelos serrados (PP20 – 20 mm de diâmetro) para evitar o deslizamento da amostra e foram cobertas com parafina líquida (Riedel-de Haen, $d_{20\text{ }^{\circ}\text{C}} = 0,827\text{-}0,890\text{ g/mL}$) para não secarem durante o ensaio.

Os testes iniciaram-se com o *setting* de temperatura, durante 5 minutos, com uma força nula (0 Pa) e a 20 °C para estabilização da temperatura das amostras. De seguida, realizaram-se sequencialmente os seguintes testes:

Varrimento em temperatura de 20 °C a 90 °C

Neste teste a pasta foi sujeita a aquecimento contínuo durante 70 minutos, de 20 °C a 90 °C. Foi utilizada uma tensão de 10 Pa e uma frequência constante de 1 Hz.

Varrimento em tempo a 90 °C

Este teste decorreu durante 30 minutos, a uma temperatura constante de 90 °C, frequência constante de 1 Hz e tensão de 10 Pa, ocorrendo desnaturação proteica.

Varrimento de temperatura de 90 °C a 5 °C

Aqui foi realizado um ciclo de arrefecimento contínuo de 90 °C até 5 °C, com uma frequência constante de 1 Hz, tensão de 20 Pa, durante 85 minutos.

Varrimento em tempo a 5 °C

Este teste de varrimento de tempo permitiu acompanhar o desenvolvimento da estrutura das amostras durante 60 minutos, a 5 °C, com frequência constante de 1 Hz e tensão de 20 Pa. Neste teste é registado os módulos de conservação e dissipação, também designados por cinéticas de maturação.

Varrimento em frequência a 5 °C

Após a maturação das amostras, realizou-se este teste com o fim de obter o espectro mecânico das amostras. Para isso foi utilizado um intervalo de frequência entre 0,01000 Hz e 100 Hz, com uma tensão de 20 Pa e temperatura de 5 °C.

A estrutura das amostras foi medida através dos parâmetros reológicos G' (módulo de conservação), que indica a componente elástica do material e G'' (módulo de dissipação) que remete para a componente viscosa. A obtenção dos resultados foi dada através do programa HAAKE RheoWin Job Manager – [Job Controller: MARS III], versão 4.30.0022.

3.5.6. Determinação da Cor

As amostras de proteínas recuperadas foram analisadas num colorímetro Konica Minolta Chroma Meters CR-410 (Konica Minolta, Japão), usando uma fonte de iluminação padrão D65 e os resultados avaliados pelo sistema de coordenadas Lab*, também designado por sistema CIELAB. Neste sistema foram medidos os parâmetros L^* , a^* e b^* . As medições no colorímetro decorreram todas à temperatura ambiente.

Em todas as determinações usou-se para calibração um padrão branco e para cada amostra foram realizadas cinco medições em diferentes pontos da mesma, calculando-se posteriormente a média e desvio padrão.

De forma a obter uma melhor avaliação da cor, os parâmetros medidos foram combinados de modo a obter os valores de brancura (*Whiteness* – W), de acordo com a seguinte expressão (Park, 2005):

$$W = 100 - [(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$$

3.7. Tratamento estatístico

O tratamento estatístico dos dados foi feito no *software* Statistica, versão 7 de 2004 (StatSoft, Inc., Tula, OK 74104, EUA). Para a comparação das amostras em estudo recorreu-se à análise de variância (One-Way ANOVA) e a verificação dos pressupostos deste teste, a normalidade e homogeneidade de variâncias, foi feita através da aplicação dos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Levene. Como não foram verificadas violações graves destes pressupostos, aplicaram-se métodos paramétricos: T-student (comparação de dois grupos) e análise de variância. Na comparação múltipla de grupos usou-se o teste Unequal N HSD. Todos os testes foram realizados ao nível de significância $\alpha=0,05$ e considerou-se significativa a diferença entre grupos sempre que $p<0,05$ (Zar, 1999)

PARTE IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Recuperação de proteínas por solubilização ácida e alcalina

4.1.1. Composição química

As misturas de peixes moídas utilizadas como matéria-prima na recuperação de proteínas por solubilização alcalina (MP_ALC) e ácida (MP_AC) e as proteínas obtidas por estes processos (PR_ALC e PR_AC, respetivamente) tinham a seguinte composição química (tabela 4):

Tabela 4- Composição química da matéria-prima utilizada na recuperação de proteínas por solubilização alcalina (MP_ALC) e ácida (MP_AC) e das proteínas obtidas por estes dois processos (PR_ALC e PR_AC).

Amostra	Humidade (%)	Gordura (%)	Proteína (%)	Cinza (%)
MP_ALC	78,93±0,09 ^b	1,32±0,19 ^a	15,74±1,13 ^a	2,88±0,02 ^a
MP_AC	75,92±0,42 ^a	5,66±0,079 ^b	13,93±0,61 ^a	2,30±0,36 ^a
PR_ALC	11,23±0,03 ^A	14,41±0,34 ^A	75,85±0,48 ^B	0,87±0,04 ^A
PR_AC	22,20±0,64 ^B	17,02±0,03 ^B	47,80±0,60 ^A	4,20±0,44 ^B

Os valores apresentados correspondem à média±desvio padrão.

Valores da mesma coluna com letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p<0,05$). As amostras foram comparadas duas a duas: matéria-prima da solubilização alcalina (MP_ALC) com matéria-prima da solubilização ácida (MP_AC) e proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) com proteínas recuperadas por solubilização ácida (PR_AC).

Na mistura de peixes usada na solubilização alcalina (MP_ALC) o teor em gordura era baixo porque nesta mistura predominavam espécies magras, que se reflete também no alto teor de humidade. Em regra, a soma dos teores de humidade e gordura é cerca de 80% (Suzuki, 1981). O teor em proteína desta mistura de peixes é o usual do pescado. Por outro lado, a grande presença de espinhas neste material justifica o teor em cinza.

O teor mais elevado de gordura da mistura de peixes utilizada na solubilização ácida (MP_AC) evidencia a presença de um maior número de espécies gordas. Isto vai traduzir-se num teor mais baixo de humidade. Também esta matéria-prima apresentava uma elevada percentagem de espinhas. O teor de proteína, embora um pouco mais baixo, encontra-se dentro da gama de variação de proteína no pescado (Sanclivier, 1983).

O teor de humidade das proteínas recuperadas por solubilização ácida (PR_AC) era relativamente elevado (22,20 %) devido à higroscopicidade das amostras. Estas proteínas apresentavam um nível significativamente mais elevado ($p<0,05$) de gordura do que as recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) em virtude de se ter utilizado uma matéria-prima mais gorda.

As PR_ALC apresentaram um teor de proteína significativamente superior ($p<0,05$) ao das proteínas recuperadas em condições ácidas (PR_AC), no entanto, o teor em cinza era significativamente inferior ($p<0,05$). As diferenças observadas no teor em cinza podem dever-se ao processo utilizado na recuperação das proteínas.

Os teores de proteína obtidos nas PR_ALC eram semelhantes aos referidos por outros autores que variam entre 75 e 90 % (Sathivel *et al.*, 2004, 2005, 2006; Shaviklo *et al.*, 2011; Pires *et al.*, 2012). Os teores em cinza e gordura referidos na literatura para proteínas secas isoladas são muito variáveis, o que é evidente uma vez que o teor de gordura depende da espécie de peixe utilizada como matéria-prima e o teor em cinza depende muito do tipo de processo utilizado para o isolamento das proteínas.

4.2. Propriedades funcionais das proteínas recuperadas

4.2.1. Capacidade de retenção de água/gordura

A capacidade de retenção de água (WHC) das proteínas recuperadas (PR_ALC e PR_AC) e do caseinato de sódio apresenta-se na figura 9.

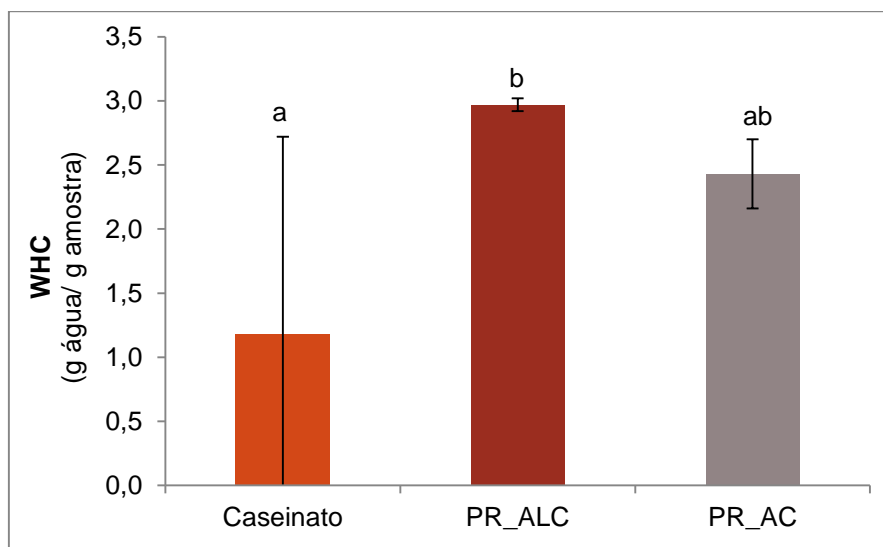


Figura 9 - Capacidade de retenção de água (WHC) das proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC) e do caseinato de sódio. Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p<0,05$).

Esta propriedade não era significativamente diferente ($p\geq0,05$) para as amostras de proteínas recuperadas. No entanto, as PR_ALC apresentaram maior capacidade de retenção de água ($p<0,05$) do que o caseinato de sódio.

O pH de solubilização parece não afetar a capacidade de retenção de água das proteínas recuperadas. Estas diferenças podem dever-se, de acordo com Choit *et al.* (2009), à composição e conformação das proteínas. Para além disso, a capacidade de retenção de água também é afetada pelo tipo e concentração de proteína, pelo número de grupos polares expostos para reagir com a água, pelo pH, presença de sais e temperatura (Barbut, 1996).

A capacidade de retenção de água das proteínas recuperadas foi semelhante à capacidade de retenção de água obtida por Shaviklo *et al.* (2011) para isolados proteicos de bacalhau (*Pollachius virens*). No entanto, num estudo feito por Freitas *et al.* (2014) com proteínas do músculo de anchova (*Engraulis anchoita*) foram obtidos resultados superiores aos da PR_ALC e das PR_AC para esta propriedade.

A capacidade de retenção de gordura (FA) das proteínas recuperadas (PR_ALC e PR_AC) e do caseinato de sódio está representada na figura 10.

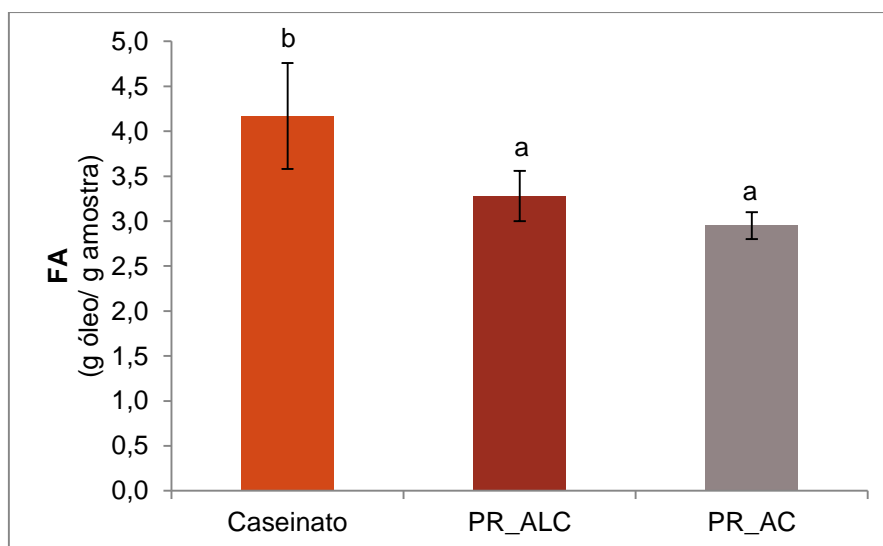


Figura 10 - Capacidade de retenção da gordura (FA) das proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC) e do caseinato de sódio.

Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Não existem diferenças significativas ($p \geq 0,05$) entre a FA das PR_ALC e das PR_AC. Assim, parece que esta propriedade, tal como a capacidade de retenção da água, não é afetada pelo pH de solubilização. No entanto, a FA do caseinato é significativamente superior ($p < 0,05$) à das proteínas recuperadas. Os resultados obtidos não estão de acordo com Lin e Zayas (1987) que referem que a menor percentagem de gordura das proteínas leva a uma maior absorção de gordura por estas.

A capacidade de retenção da gordura destas proteínas era semelhante à referida para isolados proteicos de arenque (*Clupea harengus*) e salmão (Sathivel *et al.*, 2003, 2004; 2006a). No entanto, os concentrados proteicos obtidos a partir de cabeça de salmão-rosa (*Oncorhynchus gorboscha*) e salmão-vermelho (*Oncorhynchus nerka*) apresentavam valores de FA entre 11 e 14 mL óleo/g proteína (Sathivel *et al.*, 2006a).

4.2.2. Capacidade de formação de espuma

As PR_ALC e PR_AC não têm capacidade de formação de espuma, uma vez que nas condições do ensaio o volume de espuma obtido foi zero. A capacidade de formação de espuma do caseinato obtida foi $69,4 \pm 11,25$ %.

Os resultados obtidos são mais baixos do que os referidos por Pires *et al.* (2012) para proteínas recuperadas por solubilização alcalina a partir de subprodutos de pescada e para isolados proteicos de diferentes fontes (Konieczny e Uchman, 2002). Estes autores realçam o facto das propriedades de formação de espuma dependerem da origem proteica e do método de preparação do isolado proteico. A inexistência de formação de espuma nas proteínas analisadas pode ser indicativo da incapacidade destas proteínas reduzirem a tensão superficial durante a formação de espuma (Pires, 2008).

4.2.3. Estabilidade da emulsão

A estabilidade das emulsões (ES) formadas pelas PR_ALC e PR_AC e pelo caseinato de sódio apresenta-se na figura 11.

As PR_ALC formaram emulsões significativamente mais estáveis ($p < 0,05$) do que as PR_AC. Contudo, o caseinato de sódio tem a capacidade de formar emulsões significativamente mais estáveis (100 ± 0 %) do que as proteínas recuperadas. A superfície hidrofóbica e a carga das proteínas, a sua viscosidade em solução e elasticidade-rigidez são alguns dos fatores, enunciados na literatura por Sikorski (2001), que afectam as propriedades emulsificantes das proteínas.

Konieczny e Uchman (2002) referem valores de ES entre 32 e 79,8 % para isolados proteicos obtidos a partir de proteínas de origem animal e vegetal.

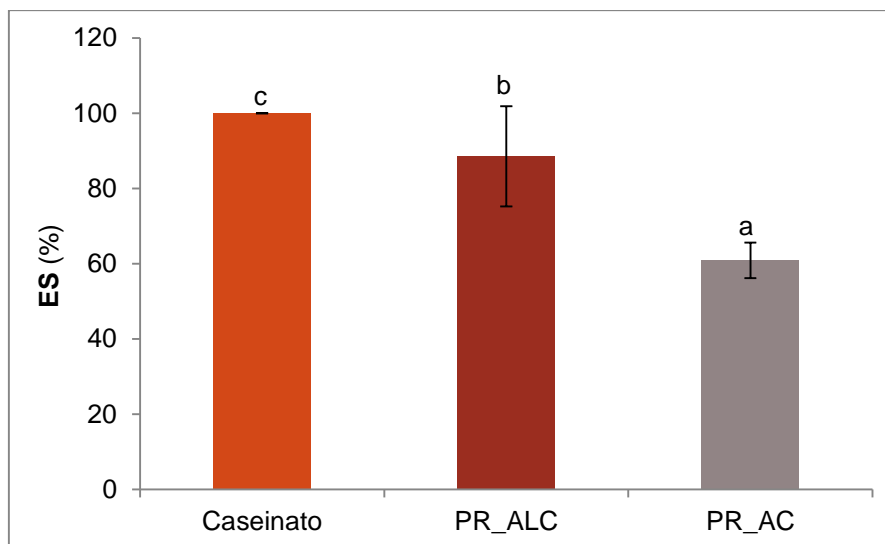


Figura 11- Estabilidade das emulsões (ES) formadas pelas proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC) e pelo caseinato de sódio. Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

4.2.4. Índice de Atividade Emulsionante

O Índice de Atividade Emulsionante (EAI) das proteínas recuperadas (PR_ALC e PR_AC) e do caseinato de sódio está representado na figura 12.

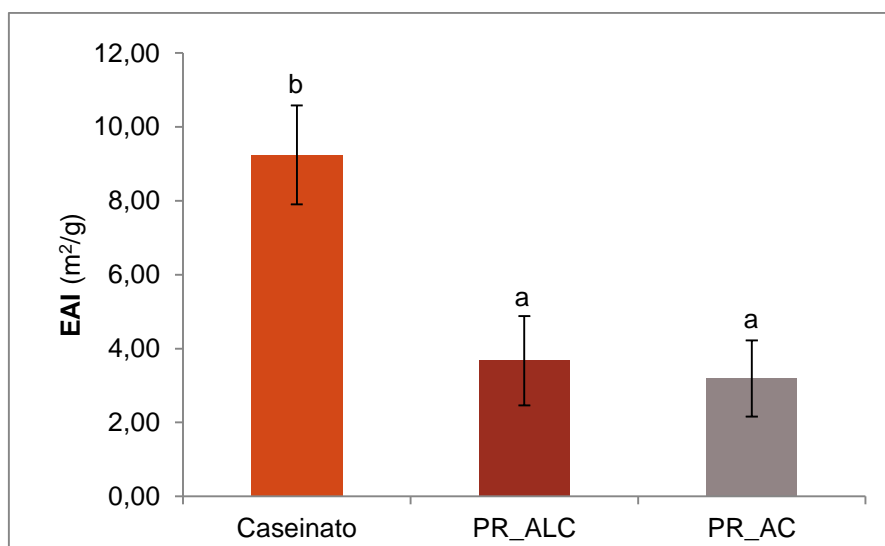


Figura 12- Índice de Atividade Emulsionante do caseinato e das proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC). Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

O EAI das PR_AC e PR_ALC não apresentava diferenças significativas ($p \geq 0,05$) e era significativamente mais baixo ($p < 0,05$) do que o do caseinato de sódio. Estes valores são consideravelmente mais baixos do que os referidos na literatura para proteínas de origem vegetal. Assim, Barac *et al.* (2010) obteve valores de EAI entre 40 a 110 m²/g em isolados proteicos de ervilha e Joshi *et al.* (2012) referem que isolados proteicos de lentilhas apresentavam EAI entre 90,3 e 123,3 m²/g. Estes resultados evidenciam o carácter consideravelmente mais hidrofóbico das proteínas em relação às de origem vegetal.

4.2.5. Capacidade de gelificação dos géis tipo *kamaboko*

4.2.5.1. Avaliação da textura

4.2.5.1.1. Teste de penetrometria

A distância e a força de rutura dos géis formados a partir de PR_ALC e PR_AC, como também a respetiva força dos géis encontram-se representadas na figura 13.

Os géis das proteínas recuperadas PR_ALC e PR_AC não apresentavam diferenças significativas em relação à força de rutura ($p \geq 0,05$). No entanto, os géis das PR_ALC parecem ser mais elásticos do que os preparados a partir das PR_AC, uma vez que a distância à rutura é significativamente maior ($p < 0,05$).

A força dos géis obtidos com as PR_ALC era significativamente superior ($p < 0,05$) à dos géis formados pelas PR_AC. Estes resultados estão de acordo com os obtidos em proteínas recuperadas por solubilização alcalina de pescada-do-Pacífico (*Merluccius productus*; Kim *et al.*, 2003), cantarilho-rabo-amarelo (*Sebastes flavidus*; Yongsawatdigul e Park, 2004), calafate-de-riscas (*Umbrina cirrosa*), tainha (*Mugil cephalus*), serra-espanhola (*Scomberomorus brasiliensis*), sarda (*Sarda sarda*; Kristinsson e Demir, 2003) e tilápia (*Oreochromis niloticus*; Ingadottir, 2004; Kristinsson e Ingadottir, 2006) que permitiram obter géis mais fortes que os géis preparados a partir de proteínas recuperadas por solubilização ácida. No entanto, Hultin e Kelleher (2000b) verificaram que isolados de proteína de bacalhau (*Gadus morhua*) e sarda obtidos por solubilização ácida também permitiam obter bons géis. Também, Kristinsson e Demir (2003) mostraram que nalguns casos tanto se obtinham bons géis a partir de proteínas recuperadas por solubilização alcalina como por solubilização ácida. Este facto levou Kristinsson *et al.* (2007) a concluir que a capacidade de gelificação das proteínas varia com a espécie e as condições utilizadas na sua recuperação.

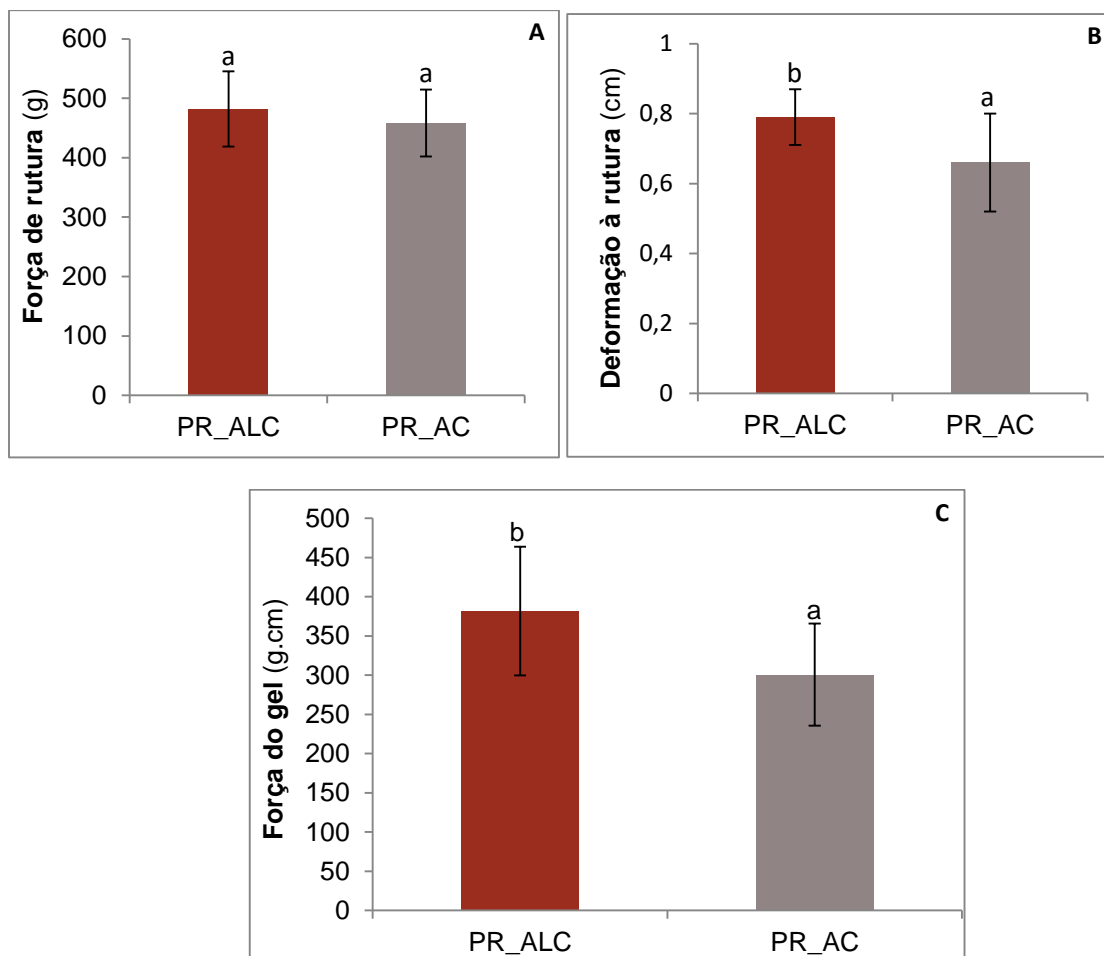


Figura 13 - Representação da força de rutura (A), da distância à rutura (B) e da força dos géis (C) das proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC). Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

As proteínas recuperadas após solubilização alcalina (PR_ALC) apresentavam uma força do gel inferior à das proteínas de pescada-do-Cabo (*Merluccius capensis*) recuperadas pelo mesmo processo (força do gel cerca de 460 g.cm, Pires *et al.*, 2012). Este valor mais baixo pode dever-se à pior qualidade da matéria-prima utilizada neste trabalho, além de se ter usado uma mistura muito variada de espécies. No entanto, Chanarat e Benjakul (2013) obtiveram valores de força do gel de 60 g.cm para géis de proteínas de cavala-da-Índia (*Rastrelliger kanagurta*) recuperadas por solubilização alcalina. O valor obtido neste trabalho era cerca de metade do referido (900 g.cm) por Jiang *et al.* (2000) para *surimi* preparado a partir de escamudo-do-Alasca (*Theragra chalcogramma*). É no entanto de ter em consideração que a metodologia seguida neste trabalho pode promover alguma desnaturação das proteínas. Além disso, as proteínas recuperadas por solubilização são constituídas pela mistura das miofibrilares e sarcoplasmáticas enquanto na obtenção do *surimi* se procede à lavagem da polpa levando à eliminação das proteínas sarcoplasmáticas. Para alguns autores (Suzuki, 1981; Shimizu *et al.*, 1992; Xiong, 1997) estas proteínas têm um efeito negativo na capacidade de gelificação ainda que para outros (Morioka e Shimizu, 1993; Ko e Huang, 1995; Yongsawatdigul e Piyadhamviboon, 2007) este efeito não é verificado. Acresce ainda que se utilizou subprodutos de pescado de baixa qualidade.

4.2.5.1.2. Teste TPA

Na tabela 5 apresentam-se os resultados obtidos da análise de perfil de textura dos géis preparados a partir PR_ALC e PR_AC.

Tabela 5 - Análise de perfil de textura dos géis formados pelas proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC).

	PR_ALC	PR_AC
Dureza (N)	24,37±7,33 ^b	8,77±1,87 ^a
Adesividade (N.sec)	8,3x10 ⁻⁴ ±0,002 ^a	4,69x10 ⁻³ ±0,007 ^a
Springiness	0,92±0,03 ^b	0,73±0,06 ^a
Coesividade	0,68±0,11 ^b	0,40±0,03 ^a
Gomosidade (N)	17,41±7,26 ^b	3,47±0,73 ^a
Mastigabilidade (N)	16,14±6,88 ^b	2,56±0,73 ^a

Os valores apresentados correspondem à média±desvio padrão.

Valores da mesma linha com letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes (p<0,05).

As PR_ALC formaram géis significativamente mais firmes ($p < 0,05$) do que as PR_AC, o que está de acordo com os resultados do teste de penetrometria referido anteriormente. Os géis formados a partir das PR_ALC eram significativamente mais elásticos e coesos ($p < 0,05$) do que os géis formados pelas PR_AC e por isso, apresentaram também uma gomosidade e mastigabilidade significativamente superior ($p < 0,05$). No entanto, a adesividade de ambos os géis de proteínas foi estatisticamente semelhante ($p \geq 0,05$) e com valores muito baixos.

Os resultados da análise de perfil de textura dos géis de PR_ALC e PR_AC são consideravelmente inferiores aos obtidos por Tahergorabi *et al.* (2012) para géis de proteínas de truta recuperadas a pH alcalino. No entanto, géis de proteínas recuperadas por solubilização alcalina de pescada-do-Cabo, obtidos por Pires *et al.* (2012), apresentaram resultados semelhantes aos géis das PR_ALC.

Vários estudos mostraram que a solubilização das proteínas do músculo do pescado em condições alcalinas permite obter proteínas recuperadas com melhores propriedades de textura do que as proteínas recuperadas em condições ácidas (Tahergorabi *et al.*, 2012).

4.2.5.2. Avaliação do comportamento reológico

Na figura 14 estão representadas as curvas de aquecimento das proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC), onde se observa a evolução dos módulos de conservação (G') e de dissipação (G'') de energia em função da temperatura de aquecimento (20 a 90 °C).

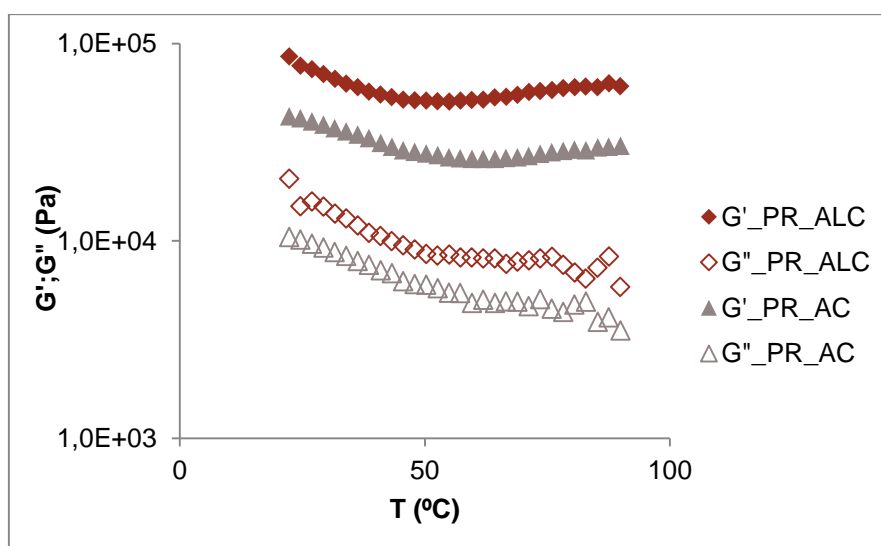


Figura 14 - Curvas de aquecimento de 20 a 90 °C dos géis de proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC).

Durante o aquecimento, verifica-se nas PR_ALC e nas PR_AC uma ligeira diminuição da componente viscoelástica G' com o aumento de temperatura até cerca de 55 °C e 60 °C, respetivamente, seguida de um ligeiro aumento até 90 °C. Quanto à componente viscosa G'' , em ambos os géis apresentou uma tendência decrescente com o aumento da temperatura. Os valores dos módulos G' e G'' das PR_ALC foram sempre superiores aos valores obtidos para os mesmos módulos para as PR_AC. A curva de aquecimento obtida apresenta um perfil típico das proteínas miofibrilares, que é caracterizado por uma diminuição acentuada de G' seguida de um aumento com o aumento da temperatura a partir de 40°C. Este comportamento tem sido referido por outros autores como Romero *et al.* (2009).

Os resultados obtidos para as PR_ALC e PR_AC foram semelhantes aos obtidos por Tomé *et al.* (2015), num estudo das propriedades reológicas de misturas de proteínas de ervilha e proteínas recuperadas por solubilização alcalina a partir de subprodutos de pescada-do-Cabo.

Na figura 15 estão representadas as curvas de arrefecimento de 20 a 90 °C das PR_ALC e das PR_AC, onde se observa a evolução dos módulos de conservação (G') e de dissipação (G'') de energia em função da diminuição da temperatura.

Durante o arrefecimento houve um aumento gradual dos módulos viscoelásticos G' e viscoso G'' em ambas as proteínas recuperadas. O aumento dos módulos viscoelásticos ocorre devido a interações físicas, principalmente por ligações de hidrogénio entre os aminoácidos e as moléculas de água, que podem ser importantes na estabilização do sistema proteico por conseguirem imobilizar água na rede proteica (Lanier *et al.*, 2005). Para ambas as proteínas recuperadas, também se verificou que G' é superior a G'' , o que indica que nas amostras é maior a componente elástica. O aumento gradual de G' com a diminuição da temperatura resulta numa contínua reorganização da rede do gel, já que as cadeias poliméricas podem unir-se dando origem a cadeias densas e ao aumento das interações electroestáticas entre as proteínas (Van Vliet *et al.*, 2002). Como a 90 °C G' era superior a G'' , em ambas os géis de proteínas recuperadas, pode concluir-se que a transição sol gel ocorre a uma temperatura superior a esta.

No estudo das propriedades reológicas de proteínas de pescada-do-cabo realizado por Pires *et al.* (2012), mencionado anteriormente, houve um aumento gradual dos valores de G' e G'' com a diminuição da temperatura, tal como verificado para as proteínas PR_ALC e PR_AC. O mesmo aconteceu num estudo realizado com misturas de proteínas de pescada e ervilha por Tomé *et al.* (2015).

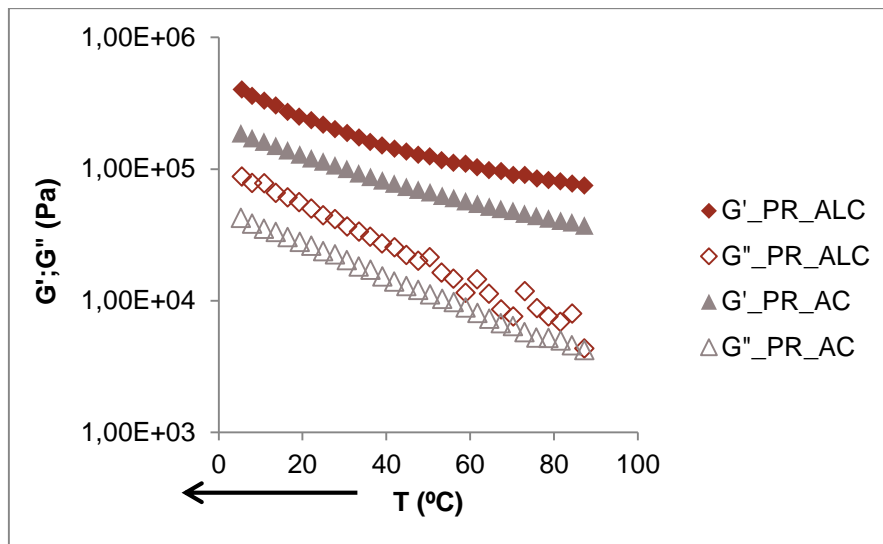


Figura 15 - Curvas de arrefecimento de 20 a 90 °C dos géis de proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC).

As cinéticas de maturação a 5 °C dos géis de proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC) apresentam-se na figura 16.

O módulo de conservação G' e o módulo de dissipação G'' dos géis das PR_ALC e das PR_AC foram praticamente constantes durante o período do ensaio. No entanto, os módulos G' e G'' das PR_ALC foram consideravelmente superiores aos respetivos módulos das PR_AC. Como a evolução da componente elástica G' para as PR_ALC e PR_AC foi praticamente constante durante o ensaio, pode dizer-se que os géis já se encontravam formados no início da maturação.

Também nos estudos de Pires *et al.* (2012) e Tomé *et al.* (2015) se verificou que os géis estavam praticamente formados no início da maturação.

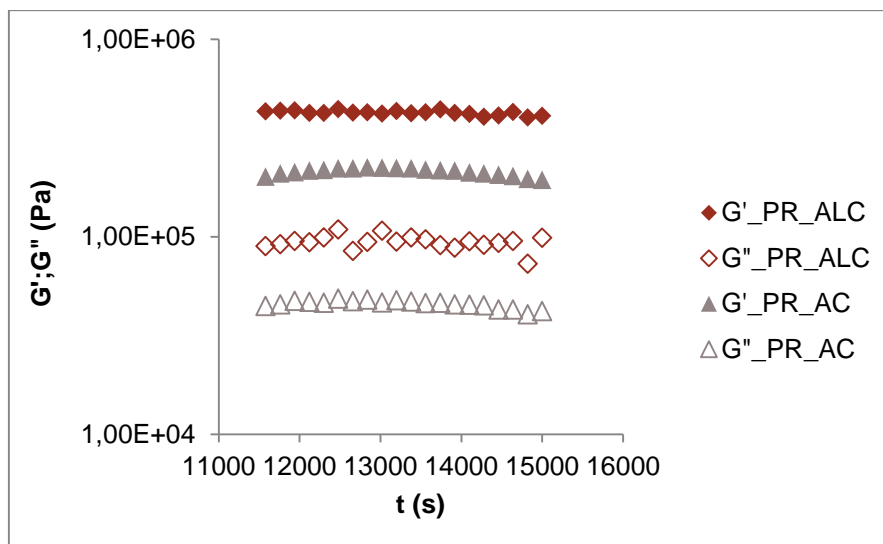


Figura 16- Cinéticas de maturação a 5 °C dos géis de proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC).

Na figura 17 estão representados os espectros mecânicos dos géis formados pelas proteínas recuperadas PR_ALC e PR_AC.

Nos géis das proteínas recuperadas PR_ALC e PR_AC, a componente viscoelástica G' foi sempre superior à componente viscosa G'' na gama de frequências testada. Além disso, verificou-se que ambos os módulos dependem da frequência, o que é característico de um gel fraco.

Este comportamento tem sido referido para géis preparados a partir de proteínas de pescado (Romero *et al.*, 2009; Pires *et al.*, 2012; Tomé *et al.*, 2015) e de outras origens (Batista *et al.*, 2005; Nunes, 2005).

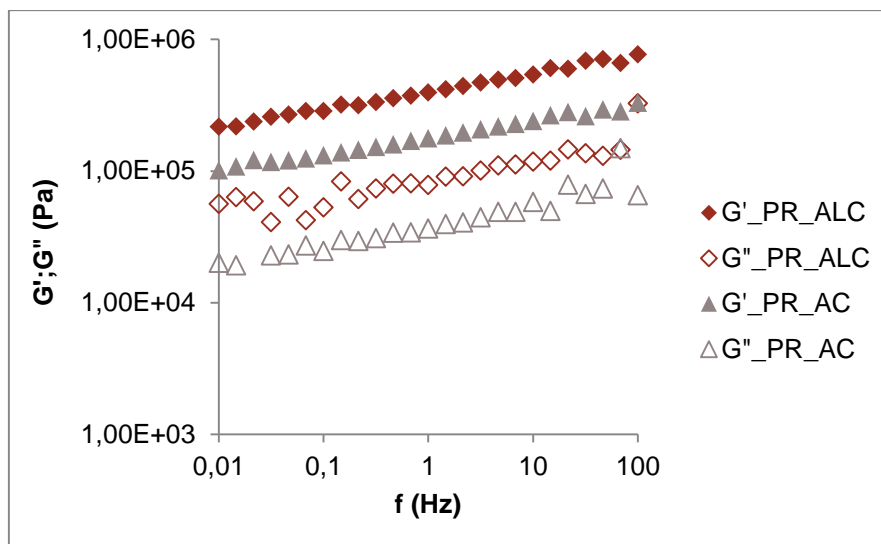


Figura 17- Espectro mecânico a 5 °C dos géis de proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC).

4.3. Determinação da cor das proteínas recuperadas

Os valores dos parâmetros da cor L^* , a^* e b^* e da brancura (W) das proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC) estão indicados na tabela 6.

Tabela 6 – Determinação instrumental da cor – coordenadas L^* , a^* e b^* e da brancura (W) das proteínas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) e por solubilização ácida (PR_AC).

Amostras	L^*	a^*	b^*	W
PR_ALC	57,89±0,66 ^b	6,89±0,07 ^b	9,29±0,19 ^a	56,33±0,66 ^b
PR_AC	50,79±0,29 ^a	4,24±0,03 ^a	13,57±0,28 ^b	48,78±0,33 ^a

Os valores apresentados correspondem à média±desvio padrão.

Valores da mesma coluna com letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

As PR_ALC apresentaram valores significativamente superiores ($p < 0,05$) aos das PR_AC nos parâmetros L^* e a^* . A coprecipitação das proteínas heme com as proteínas recuperadas a pH ácido (Pires, 2008) pode justificar o valor mais baixo de L^* . A maior presença de pigmentos do músculo escuro das espécies utilizadas na preparação das PR_ALC pode justificar o valor mais elevado de a^* . As PR_AC apresentavam um valor de b^* significativamente mais alto ($p < 0,05$) o que pode dever-se à maior percentagem de gordura nestas proteínas.

O valor de L^* de proteínas recuperadas por solubilização alcalina a partir de peixe-gato era superior ao das proteínas recuperadas desta espécie por solubilização ácida (Kristinsson e Demir, 2003). Porém, estes autores não verificaram esta tendência em as espécies que estudaram. Por outro lado, o valor de b^* das proteínas recuperadas por solubilização ácida era superior ao das proteínas recuperadas por solubilização alcalina em todas as espécies (peixe-gato, cavala, tainha, rabeta) estudadas por estes autores.

A maior brancura das PR_ALC deve-se ao maior de L^* que determina este parâmetro.

As proteínas recuperadas a partir de alabote-dente-curvo (*Atheresthes stomias*, Sathivel *et al.*, 2005) e escamudo-do-Alasca (*Theragra chalcogramma*, Sathivel *et al.*, 2006b) apresentavam valores de L^* e a^* , respectivamente, mais alto e mais baixo do que os verificados neste trabalho. Por sua vez, o valor de b^* das proteínas de alabote-dente-curvo era semelhante ao das PR_AC, mas o de escamudo-do- Alasca era mais elevado (18,9) do que o das proteínas preparadas neste trabalho.

Num estudo feito por Pires *et al.* (2012) com proteínas recuperadas de subprodutos de pescada, proteínas de ervilha, proteínas de soja e proteínas de clara de ovo, os valores de L^* e W foram consideravelmente superiores aos obtidos nas PR_ALC e PR_AC. Todavia, os valores de b^* eram semelhantes situando-se entre 9,14 e 12,15.

Há múltiplas referências à cor de proteínas, mas dizem respeito a produtos gelificados cujos valores dos parâmetros não são diretamente comparáveis aos medidos em proteínas secas.

4.4. Remoção dos fosfolípidos

4.4.1. Distribuição dos fosfolípidos

A partir da determinação do teor de fosfolípidos das frações obtidas após a 1ª centrifugação (ver figura 7) na solubilização ácida (relações 1:6 e 1:9 peixe:água) e na solubilização alcalina (relação 1:9 peixe:água), foi possível verificar qual a distribuição dos fosfolípidos pelas diferentes frações, como se pode observar na figura 18.

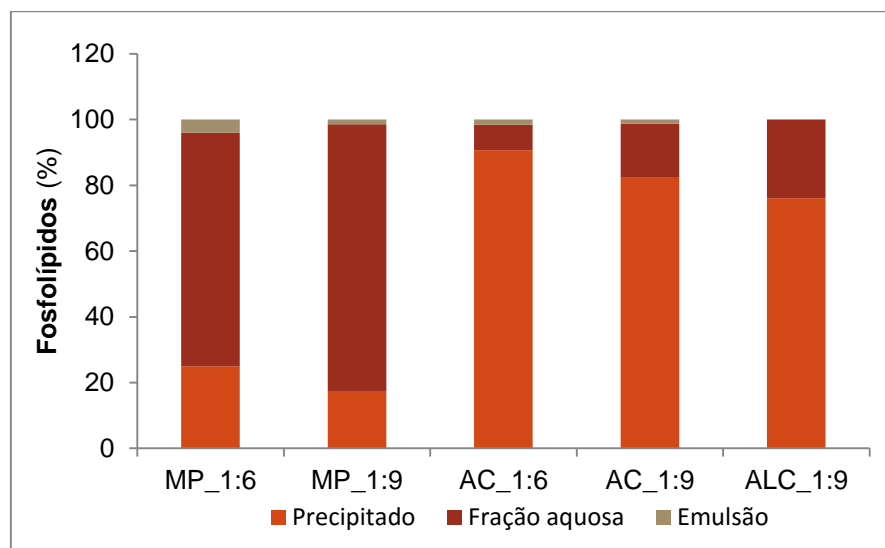


Figura 18 - Distribuição dos fosfolípidos nas várias frações na matéria-prima moída (MP) e após solubilização ácida (AC) ou solubilização alcalina (ALC) com as relações 1:6 e 1:9 (peixe:água).

Quando se fez uma suspensão da matéria-prima em água registou-se uma elevada solubilização dos fosfolípidos na fração aquosa (cerca 70 %) e esta solubilização acentuava-se em cerca de 10% quando se aumentava a relação peixe:água. A solubilização ácida levava a uma considerável diminuição da percentagem de fosfolípidos na fração aquosa, a qual também aumentava com o aumento da relação peixe:água, tal como verificado na matéria-prima. Na solubilização alcalina ocorria também uma remoção dos fosfolípidos ficando, no entanto, na fração aquosa uma percentagem de cerca de 25 %. O precipitado obtido na solubilização ácida com a relação 1:6 apresentava uma maior percentagem de fosfolípidos (90,7 %) do que o precipitado resultante da solubilização nas mesmas condições, mas com a relação 1:9 (82,4 %). Isto resulta da maior quantidade de água que se utiliza nesta relação que proporciona uma maior solubilização dos fosfolípidos.

Apesar da elevada percentagem de remoção de fosfolípidos registada nestes processos, os fosfolípidos remanescentes coprecipitam com as proteínas no pl e sofrem processos oxidativos responsáveis pelo desenvolvimento de cheiros desagradáveis que comprometem a estabilidade e qualidade das proteínas obtidas.

4.4.2- Efeito da concentração de CaCl_2 e ácido cítrico

O efeito do CaCl_2 e do ácido cítrico na remoção dos fosfolípidos pode ser explicado pelo facto desses compostos quebrarem as ligações entre as membranas e as proteínas do citoesqueleto, que são proteínas que interagem com as membranas dos fosfolípidos (Liang e Hultin, 2005). Liang e Hultin (2005) acrescentam que o tratamento com ácido cítrico e CaCl_2 , na presença de concentrações elevadas de CaCl_2 ajuda a acelerar a libertação das membranas dos fosfolípidos das proteínas do citoesqueleto. O ácido cítrico pode funcionar como agente de ligação dos resíduos de aminoácidos básicos das proteínas do citoesqueleto, que competem com os fosfolípidos ácidos das membranas. A interação pode ser feita através dos grupos carboxilo do ácido cítrico que interagem com os resíduos de aminoácidos básicos das proteínas do citoesqueleto. As membranas que se libertam das proteínas do citoesqueleto podem depois formar agregados ou entrarem em fusão devido ao pH baixo que se regista no final ou através do cross-linking induzido pelo CaCl_2 . A agregação ou a fusão das membranas pode ser responsável pela sedimentação das mesmas no músculo solubilizado durante a centrifugação (Liang e Hultin, 2005).

O efeito da concentração de CaCl_2 (0-50 mM) na remoção dos fosfolípidos das proteínas solubilizadas a pH ácido com a relação 1:6 (peixe:água) na presença de 5 mM de ácido cítrico mostra-se na figura 19.

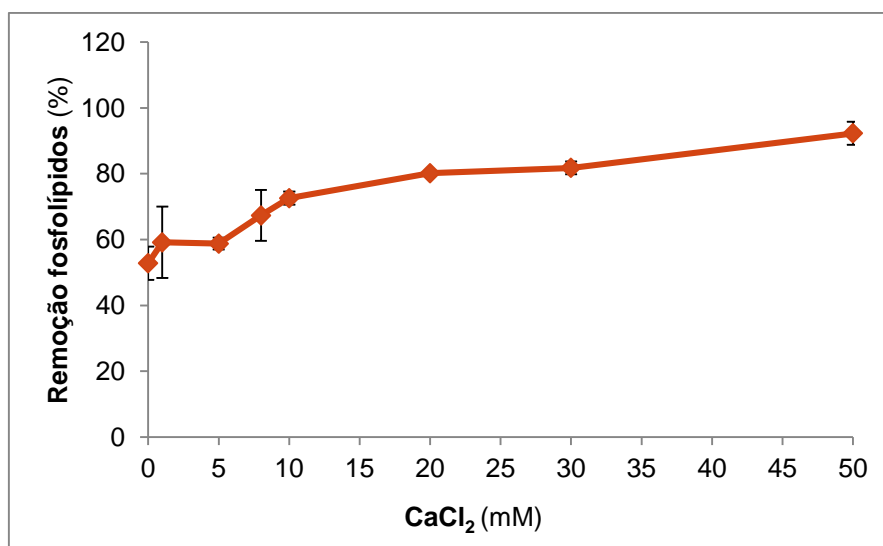


Figura 19 - Efeito da concentração de CaCl_2 na remoção dos fosfolípidos das proteínas solubilizadas em condições ácidas com a relação 1:6 (peixe:água) na presença de 5 mM de ácido cítrico.

Cerca de 70 % dos fosfolípidos são removidos na concentração de 8 mM de CaCl_2 e cerca de 70-90% nas concentrações de 10 mM de CaCl_2 e superiores. A mudança rápida na remoção dos fosfolípidos ocorre entre as concentrações de 5 mM e 10 mM de CaCl_2 .

Na figura 20 mostra-se o efeito da concentração de ácido cítrico (0-10 mM) na remoção dos fosfolípidos das proteínas solubilizadas em condições ácidas com a relação 1:6 (peixe:água) na presença de 8 mM de CaCl_2 .

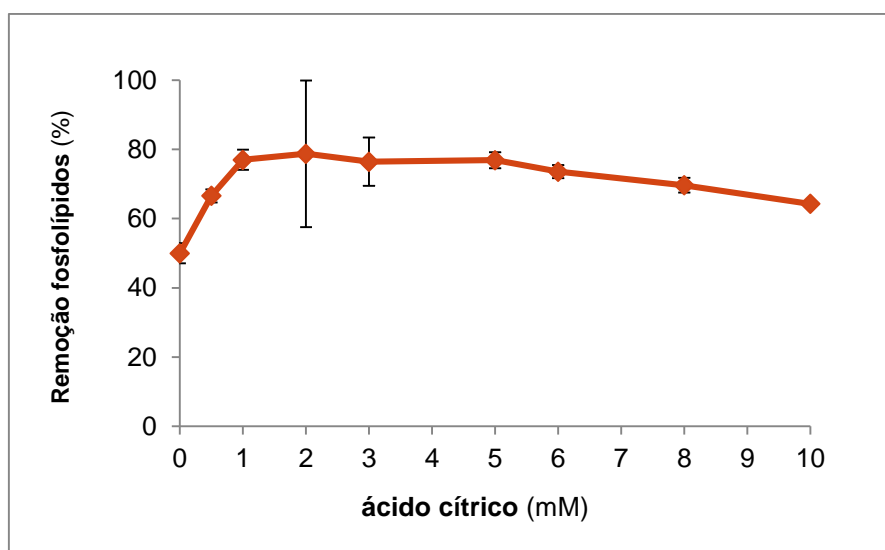


Figura 20 - Efeito da concentração de ácido cítrico na remoção dos fosfolípidos das proteínas solubilizadas com a relação 1:6 (peixe:água) na presença de 8 mM de CaCl_2 .

O máximo de remoção de fosfolípidos (cerca de 80 %) alcança-se entre as concentrações de 1 mM a 5 mM de ácido cítrico. Há um aumento rápido na remoção (50-80 %) até à concentração de 1 mM de ácido cítrico. Na concentração de 8 mM de ácido cítrico, a remoção de fosfolípidos não é máxima, mas a partir daí o aumento da concentração de ácido cítrico prejudica a separação da fase aquosa do sedimento (Liang e Hultin, 2005).

Atendendo aos resultados obtidos, considera-se que o tratamento com concentrações de 5 a 10 mM de CaCl_2 e 1 a 5 mM de ácido cítrico permitirá atingir 80 % de remoção de fosfolípidos. Efetivamente, concentrações de ácido cítrico superiores a 5 mM levam a uma diminuição da remoção e, por outro lado, o aumento da concentração de CaCl_2 de 10 para 30 mM apenas resultou num aumento de cerca de 5 %.

4.4.3. Efeito do pH de solubilização e da relação peixe:água

Na figura 21 representa-se a distribuição dos fosfolípidos nas várias frações obtidas após o tratamento com CaCl_2 e ácido cítrico para eliminação dos fosfolípidos presentes nas proteínas solubilizadas em meio ácido e alcalino.

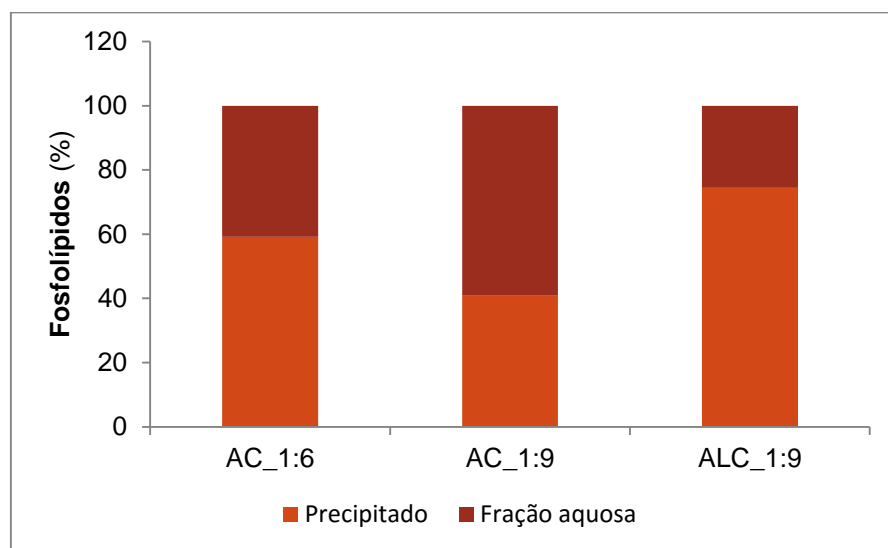


Figura 21 - Distribuição dos fosfolípidos nas várias frações obtidas após tratamento com CaCl_2 8 mM e ácido cítrico 5 mM na solubilização ácida (AC) e alcalina (ALC).

Os resultados mostram que o precipitado obtido a partir das proteínas solubilizadas com a relação peixe:água 1:6 apresentava uma maior percentagem de fosfolípidos do que o proveniente da solubilização com a relação peixe:água 1:9. Após o tratamento das proteínas solubilizadas a pH alcalino registou-se um aumento de aproximadamente 50 % do teor de fosfolípidos no precipitado em relação ao verificado no precipitado resultante do tratamento das proteínas solubilizadas em meio ácido com a mesma relação peixe:água.

Na figura 22 mostra-se o efeito do pH de solubilização e da relação peixe:água na remoção dos fosfolípidos.

Nas proteínas solubilizadas em meio ácido (AC), o tratamento de remoção de fosfolípidos foi mais eficiente no processo com a menor relação peixe:água (1:6) ao permitir remover cerca de 20 % mais de fosfolípidos. Por outro lado, a remoção foi mais eficiente nas proteínas solubilizadas em meio alcalino (ALC 1:9), tendo-se atingido cerca de 75 % de remoção.

Gehring *et al.* (2010) já tinham verificado que a solubilização conduzida em condições alcalinas é mais eficiente na remoção de lípidos do que a solubilização ácida. Também Yarnpakdee *et al.* (2012) verificaram que na recuperação de proteínas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por solubilização alcalina conseguiam obter uma maior percentagem de remoção de fosfolípidos.

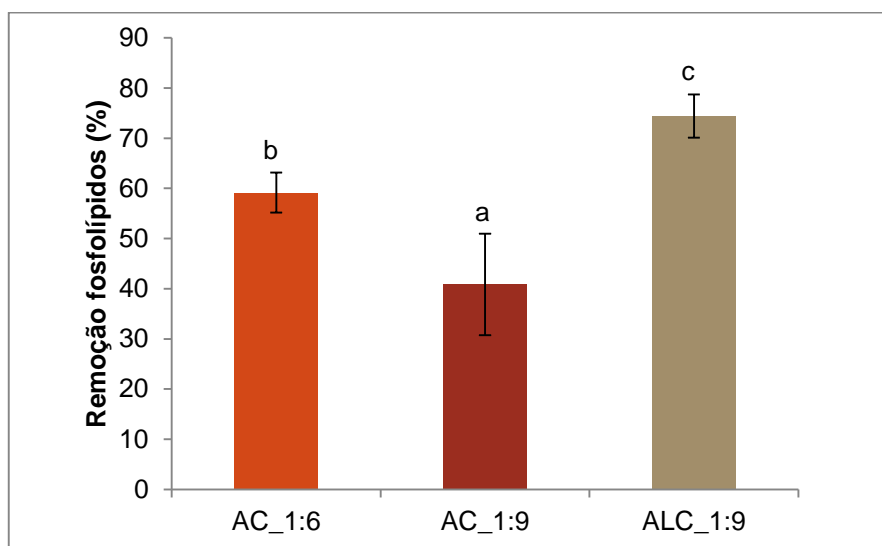


Figura 22 - Efeito do pH de solubilização e da relação (peixe:água) na remoção dos fosfolípidos após tratamento com 5 mM de ácido cítrico e 8 mM de CaCl₂.

PARTE V – CONCLUSÃO

5.1. Conclusões gerais

As proteínas secas recuperadas por solubilização alcalina (PR_ALC) ou ácida (PR_AC) seguida de precipitação no pl apresentavam teores proteicos de 75,9 % e 47,8 % e teores de gordura de 14,4 % e 17,0 %, respetivamente.

No que respeita à cor as PR_ALC tinham valores de L^* e a^* mais elevados do que as PR_AC, mas o valor de b^* destas proteínas era mais baixo. PR_ALC eram também mais brancas do que as PR_AC.

Relativamente às propriedades funcionais as PR_ALC tinham maior capacidade de retenção de água do que as PR_AC. No entanto, as proteínas recuperadas pelos dois métodos tinham capacidade de retenção de gordura e Índice de Atividade Emulsionante semelhantes sendo, respetivamente, 3,19 e 3,67 m^2/g para as PR_AC e PR_ALC. As proteínas recuperadas não apresentavam capacidade de formação de espuma nas condições do ensaio e a estabilidade de emulsão foi maior nas emulsões preparadas a partir das PR_ALC. A força dos géis preparados a partir das PR_ALC (381,83 g.cm) era superior à dos géis preparados com as PR_AC (300,71 g.cm). A mesma tendência foi observada na dureza, obtendo-se 24,37 N nos géis das PR_ALC, enquanto nos géis das PR_AC apenas se registou o valor de 8,77 N. Estes resultados juntamente com os de outros parâmetros da textura levam a concluir que as PR_ALC apresentavam melhores propriedades de textura.

O comportamento viscoelástico das proteínas recuperadas durante o aquecimento foi típico de proteínas miofibrilares, ou seja, diminuição acentuada de G' seguida de um aumento com o aumento da temperatura a partir de 55 °C. Durante o arrefecimento, registou-se um aumento gradual dos módulos viscoelásticos G' e G'' em ambas as proteínas recuperadas e, dado que a 90 °C G' era superior a G'' , em ambos os casos, pode concluir-se que a transição sol-gel ocorria a uma temperatura superior. A evolução do valor de G' durante a maturação indicou que os géis das proteínas recuperadas já se encontravam formados no início deste processo. Os géis formados pelas proteínas recuperadas apresentaram as características de um gel fraco pois G' foi sempre superior a G'' e ambos os módulos dependiam da frequência. As propriedades reológicas das PR_ALC eram melhores do que as das PR_AC, visto que os valores dos módulos G' e G'' das PR_ALC eram sempre superiores aos das PR_AC.

A solubilização ácida permitiu uma remoção de fosfolípidos de cerca 90 % usando a relação peixe:água de 1:6 e de 82 % quando a relação era de 1:9. Na solubilização alcalina a remoção atingida foi cerca de 75 % usando também a relação de 1:9.

No tratamento das proteínas solubilizadas com diferentes concentrações de ácido cítrico e CaCl_2 , observou-se que concentrações de 5 a 10 mM de CaCl_2 e 1 a 5 mM de ácido cítrico eram as que permitiam maior remoção de fosfolípidos.

O tratamento com ácido cítrico 5 mM e CaCl_2 8 mM da solução de proteínas solubilizadas permitiu obter as seguintes percentagens de remoção dos fosfolípidos:

Meio ácido, relação 1:6 – 59; Meio ácido, relação 1:9 – 41; Meio alcalino, relação 1:9 – 74.

Referências bibliográficas

- Alves, M. M. M. (2003). *A Reologia. A Química e a Reologia no Processamento de Alimentos*. Lisboa: Instituto Piaget – Ciência e Técnica.
- AOAC (1998). *Official Methods of Analysis*. 16th Ed., 4th revision. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.
- Balti, R.; Bougatef, A.; Ali, N. E.H, Zekri, D.; Barkia, A.; Nasri, M. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties and angiotensin I-converting enzyme-inhibitory activity of protein hydrolysates from cuttlefish (*Sepia officinalis*) by-products. *J. Sci Food Agric.*, 90: 2006-2014.
- Barac, M.; Cabrilo, S.; Pesic, M; Stanojevic, S.; Zilic, S.; Macej, O., Ristic, N. (2010). Profile and functional properties of seed proteins from six pea (*Pisum sativum*) genotypes. *Int. J. Mol. Sci.*, 11, 4973-4990.
- Barbut, S. (1996). Determining water and fat holding. *In: Methods of testing protein functionality*, Hall, G.M. (Ed), Blackie Academic & Professional, New York, USA, 186-225.
- Batista, A. P.; Portugal, C. A. M.; Sousa, I.; Crespo, J. G.; Raymundo, A. (2005). Accessing gelling ability of vegetable proteins using rheological and fluorescence techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*, 36:135–143.
- Chanarat, S.; Benjakul, S. (2013). Impact of microbial transglutaminase on gelling properties of Indian mackerel fish protein isolates. *Food Chemistry*, 136: 929–937.
- Choi, Y.-J.; Hur, S.; Choi, B.-D.; Konno, K.; Park, J. W. (2009). Enzymatic hydrolysis of recovered protein from frozen small croacker and functional properties of its hydrolysates. *J. Food Sci.*, v.74 (1), C17- C23.
- Damodaran, S. (1997). Food proteins: An overview. *In: Food proteins and their applications*. Damodaran, S.; Paraf, A. (Eds), Marcel Dekker Inc., New York, USA, 1-21.
- Diniz, M; Martin, A. M. (1997). Effects of the extent of enzymatic hydrolysis on functional properties of shark protein hydrolysate. *Lebensm. Wiss Technol.*, 30: 266-272.
- Dumay, J., Donnay-Moreno, C.; Barnathan, G; Jaouen, P.; Carbonneau, M. E.; Bergé, J. P. (2006). Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochem*, 41: 2327-2332.
- Dumay, J.; Allery, M.; Donnay-Moreno, C.; Barnathan, G; Jaouen, P.; Carbonneau, M. E.; Bergé, J. P. (2009). Optimization of hydrolysis of sardine (*Sardina pilchardus*) heads with Protamex: enhancement of lipid and phospholipid extraction. *J. Sci. Food Agric.*, 89: 1599-1606.
- Folch, J.; Less, M.; Sloane Stantley, G. H. (1956). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, 226: 497-509

Food and Agriculture Organization of the United Nations (2012). The state of world fisheries and aquaculture. FAO statistical yearbook, Rome, Italy. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf>

Freitas, I. R.; Cortez-Vega, W. R.; Prentice, C. (2014). Evaluation of properties of protein recovered from fish muscles by acid solubilization process. *International Food Research Journal*, 22 (3): 1067-1073

Gehring, C. K.; Gigliotti, J. C.; Moritz, J. S.; Tou, J. C.; Jaczynski, J. (2010). *Food Chemistry*, 124: 422-431.

Hultin, H. O.; Kelleher, S. (2000b). Surimi processing from dark muscle fish. *In: Surimi and Surimi Seafood*, Park, J. W. (Ed), CRC.Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, 59-77.

Hultin, H. O.; Kelleher, S. D. (1999). Process for isolating a protein composition from a muscle source and protein composition. Rockport, Mass.: Advanced Protein Technologies. U.S. patent 6,005,073.

Hultin, H. O.; Kristinsson, H. G.; Lanier, T. C.; Park, J. W. (2005). Process for recovery of functional proteins by pH shifts. *In: Surimi and Surimi Seafood*, Park, J. W. (Ed), CRC.Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, 107-140.

Hultin, H. O.; Kelleher, S.. (2000a). High efficiency alkaline protein extraction. U.S. patent 6,1336,959.

Ingadottir, B. (2004). The use of acid and alkali aided solubilization and precipitation methods to recover functional proteins from tilapia white muscle. Ph.D.. thesis, Gainesville, University of Florida, 92p.

Jaczynski, J. (2008). Protein and lipid recovery from food processing by-products using isoelectric solubilization/precipitation. *In: Food Chemistry Research Developments*, Papadopoulos, K. N. (Ed), Nova Science Publisher, Inc., 31p.

Jiang, S.; Hsieh J.-F.; HO, M.-L.; Chung, Y.-C. (2000). Microbial transglutaminase affects gel properties of golden threadfin-bream and pollack surimi. *Journal of Food Science*, v.65 (4), 694-698.

Joshi, M.; Adhikari, B.; Aldred, P.; Panozzo, J.F; Kasapis, S.; Barrow, C.J. (2012). Interfacial and emulsifying properties of lentil protein isolate. *Food Chemistry*, 134: 1343–1353.

Kijowski, J. (2001). Muscle proteins. *In: Chemical & functional properties of food proteins*, Sikorski, Z. (Ed), Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, USA, 233-264.

Kim, Y. S.; Park, J. W.; Choi, Y. J. (2003). New approaches for the effective recovery of fish proteins and their physicochemical characteristics. *Fish. Sci.*, 69: 1231-1239.

Kim, Y. S.; Park, J. W.; Yoon, W. B. (2005). Rheology and Texture properties of surimi gels. *In: Surimi and Surimi Seafood*, Park, J. W. (Ed), CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, 491-576.

- Kinsella, J. E. (1976). Functional properties of proteins in food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 7: 219
- Ko, W. C.; Huang, M. S. (1995). Contribution of milkfish sarcoplasmic protein to the thermal gelation of myofibrillar protein. *Fish. Sci.*, 61: 3258-3263.
- Konieczny, P.; Uchman, W. (2002). Comparative characterization of surface hydrophobicity and other physico-chemical properties of selected protein preparations. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. Food Sci. Technol.*, 5 (2): 12.
- Kristinsson, H. G.; Demir, N. (2003). Functional fish protein ingredients from fish species of warm and temperate waters: comparison of acid and alkali-aided processing vs. conventional surimi processing. *In: Advances in seafood byproducts*, Bechtel, P.; Fairbanks, A. K. (Eds), Univ. Alaska Press, 277-295.
- Kristinsson, H. G.; Ingadottir, B., 2006. Recovery and properties of muscle proteins extracted from tilapia (*Oreochromis niloticus*) light muscle by pH shift processing. *J. Food Sci.*, 70 (3): E132-E141.
- Kristinsson, H. G.; Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40 (1), 43-81.
- Kristinsson, H. G.; Theodore, A. E.; Ingadottir, B. (2007). Chemical processing methods for protein recovery from marine by-products and underutilized fish species *In: Maximizing the value of marine by-products*, Shaidi, F. (Ed), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 144-163.
- Lanier, T. C.; Carvajal, P. (2005). Surimi gelation chemistry. *In: Surimi and Surimi Seafood.*, Park, J. W. (Ed), CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, 435-489.
- Liang, Y.; Hultin, H. O. (2005). Separation of membranes from acid-solubilized fish muscle proteins with the aid of calcium ions and organic acids. *J Agric. Food Chem.*, 53: 3008-3016.
- Lin, C. S.; Zayas, J. F. (1987). Functionality of defatted corn germ proteins in a model system: fat binding capacity and water retention. *J. Food Sci.*, 52: 1308-1311.
- Mendes, R. (1991). Proteínas de pescado – composição, alterações e aspectos funcionais. Departamento de Tecnologia dos Produtos Aquáticos, INIP, Lisboa, Portugal, 50p.
- Mendes, R. (2001). Polpas e surimi de pequenos pelágicos da costa portuguesa. Departamento de Inovação Tecnológica e Valorização dos produtos da pesca, Instituto de Investigação das Pescas e do Mar, Lisboa, Portugal, 97p.
- Morioka, K.; Shimizu, Y. (1993). Relationship between the heat-gelling property and composition of fish sarcoplasmic proteins. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56: 929-933.
- Niwa, E. (1992). Chemistry of surimi gelation. *In: Surimi Technology*, Lanier, T. C.; Lee, C. M. (Eds), Marcel Dekker Inc., New York, USA, 389-427.

Norma Portuguesa NP 1972 (2009). Determinação do teor de matéria gorda livre. *Instituto Português da Qualidade*, 7p.

Norma Portuguesa NP 2032 (2009). Determinação do teor de cinza total. *Instituto Português da Qualidade*, 7p.

Norma Portuguesa NP 2282 (2009). Determinação da humidade. *Instituto Português da Qualidade*, 7p.

Nunes, M. C. (2003). Propriedades Funcionais das Proteínas. *A Química e a Reologia no Processamento de Alimentos*. Instituto Piaget – Ciência e Técnica, Lisboa, Portugal.

Nunes, M. C. (2005). Interações proteína/polissacárido em géis proteicos de origem vegetal. Tese de Doutoramento em Engenharia Agro-Industrial. Universidade Técnica de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal, 210p.

Pires, C. M. F. (2008). Recuperação, caracterização e aplicações de proteínas recuperadas de subprodutos e espécies subaproveitadas. Dissertação para provas de acesso à categoria de investigador auxiliar – Unidade de Valorização dos Produtos da Pesca e da Aquicultura. Instituto de Investigação das Pescas e do Mar, Lisboa, Portugal, 253p.

Pires, C.; Costa, S.; Batista, A.P.; Nunes, M. C.; Raymundo, A.; Batista, I. (2012). Properties of protein powder prepared from Cape hake by-products. *Journal of Food Engineering*, 108: 268-275.

Raymundo, A. (2003). Emulsões Alimentares. *A Química e a Reologia no Processamento de Alimentos*. Instituto Piaget – Ciência e Técnica, Lisboa, Portugal.

Romero A.; Cordobés F.; Puppo M.C.; Villanueva A.; Pedroche J.; Guerrero A. (2009) Linear viscoelasticity and microstructure of heat-induced crayfish protein isolate gels. *Food Hydrocolloids* 23:964–972.

Sainclivier, M. (1983). L'Industrie alimentaire halieutique: Le poisson matière première. *In: Bulletin Scientifique et Technique de L'École Nationale Supérieure Agronomique et du Centre de Recherches de Rennes, Sciences Agronomiques Rennes (Ed)*, France, 263p.

Saint-Denis, T.; Goupy, J. (2004). Optimization of a nitrogen analyser based on the Dumas method. *Analytica Chimica Acta*, 515: 191–198.

Sathivel, S., Bechtel, P.J., Babbitt, J.K., Prinyawiwatkul, W., Negulescu, I.I., Reppond, K.D. (2004). Properties of protein powders from arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*) and herring (*Clupea harengus*) byproducts. *J. Agric. Food. Chem.*, 52: 5040–5046.

Sathivel, S., Bechtel, P.J., Babbitt, J.K., Prinyawiwatkul, W., Patterson, M. (2005). Functional, nutritional, and rheological properties of protein powders from arrowtooth flounder and their application in mayonnaise. *J. Food Sci.* 70 (2), E57–E63.

Sathivel, S., Bechtel, P.J., Prinyawiwatkul, W. (2006a). Physicochemical and rheological properties of salmon protein powders. *Int. J. Food Eng.* 2 (2) (Article 3. (Disponível em: <http://www.bepress.com/ijfe/vol2/iss2/art3>)).

Sathivel, S.; Bechtel, P. J. (2006b). Properties of soluble protein powders from Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*). *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 520–529.

Sathivel, S.; Bechtel, P. J.; Babbitt, J. K; Smiley, S.; Crapo, C.; Reppond, K. D.; Prinyawiwatkul, W. (2003). Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) byproduct hydrolysates. *J. Food Sci.*, 68 (7): 2196-2200.

Shaviklo, G.R., Thorkelsson, G., Arason, S., Sveinsdottir, K. (2011). Characteristics of freeze-dried fish protein isolated from saithe (*Pollachius virens*). *J. Food Sci. Technol.*, 49 (3) : 309-18.

Shimizu, Y.; Toyohara, H.; Lanier, T. C. (1992). Surimi production from fatty and dark-fleshed species. *In: Surimi Technology*, Lanier, T. C.; Lee, C. M. (Eds), Marcel Dekker Inc., New York, USA, 181-207.

Sikorski, Z. (2001). Functional properties of proteins in food systems. *In: Chemical & Functional properties of food proteins*, Sikorski, Z. (Ed), Technomic Publishing Co, Inc., Lancaster, USA, 113-132.

Sikorski, Z. (2002). Chemical and functional properties of food components. Sikorski, Z. (Ed), CRC Press LCC, Boca Raton, Florida, USA, 367p.

Smedes, F. (1999). Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *In: Analyst*, 124: 1711–1718.

Sousa, I. (2001). A reologia dos produtos alimentares. *In: Reologia e suas aplicações industriais*. Castro, A. G.; Covas, J. A.; Diogo, A. C. (Eds.), Instituto Piaget, 131-158.

Stryer, L. (1996). *In: Bioquímica*, Stryer, L.; Tymoczko, J.; Berg, J. M., Guanabara Koogan (Eds), São Paulo, Brasil, 1104p.

Suzuki, T. (1981). Fish and krill proteins processing technology. *Applied Science Publ.*, London, UK, 260p.

Suzuki, T. (1987). Tecnología de las proteínas de pescado y krill. Acribia, S.A., Zaragoza, España, 230p.

Szczesniak, A. S. (2002). Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference*, 13:215 –225.

Taherghorabi, R.; Beamer, S. K.; Matak, K. E.; Jaczynski, J. (2012). Functional food products made from fish protein isolate recovered with isoelectric solubilization/precipitation. *Food Science and Technology*, 48: 89-95.

- Tahergorabi, R.; Jaczynski, J. (2014). Isoelectric solubilization/precipitation as a means to recover protein and lipids from seafood by-products. *In: Seafood Processing By-products*, Kim, S-K (Ed), Springer, London, UK, 101-123.
- Tomé, A. S.; Pires, C.; Batista, I.; Sousa, I.; Raymundo, A. (2015). Proteins gels and emulsions from mixtures of Cape hake and pea proteins. *J. Sci. Food Agric.*, 95 (2): 289-298.
- Van Vliet; T., Martin; A.H.; Bos, M. A (2002). Gelation and interfacial behavior of vegetable proteins. *Current opinion in Colloid & Interface Science*, 7: 462-468.
- Xiong, Y. L. (1997). Structure-function relationships of muscle proteins. *In: Food proteins and their applications*, Damodaran S.; Paraf, A. (Eds), Marcel Dekker Inc., New York, USA, 341-392.
- Yarnpakdee, S.; Benjakul, S.; Kristinsson, H. G. (2012). Effect of pretreatments on chemical compositions of mince from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and fishy odor development in protein hydrolysate. *International Aquatic Research*, 4:7.
- Yongsawatdigul, J.; Park, J. W. (2004). Effects of alkali and acid solubilization on gelation characteristics of rockfish muscle proteins. *Journal of Food Science*, 69 (7), 499-505.
- Yongsawatdigul, J.; Piyadhamviboon, P. (2007). Gel-enhancing effect and protein cross-linkin ability of tilapia sarcoplasmic proteins. *J. Sci. Food Agric.*, 87: 2810-2816.
- Zar, J. H (1999). Biostatistical analysis, 4th edition. Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA, 663p.